

DETEKSI BAKTERI *Salmonella* PADA SAMPEL MAKANAN DAN
MINUMAN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

Oleh:
ARUM WIDYASMARA
0304057028



DEPOK
2008

DETEKSI BAKTERI *Salmonella* PADA SAMPEL MAKANAN DAN
MINUMAN DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

ARUM WIDYASMARA

0304057028



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2008

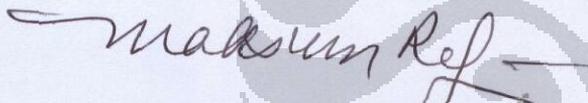
SKRIPSI : DETEKSI BAKTERI *Salmonella* PADA SAMPEL
MAKANAN DAN MINUMAN DENGAN METODE
POLYMERASE CHAIN REACTION

NAMA : ARUM WIDYASMARA

NPM : 0304057028

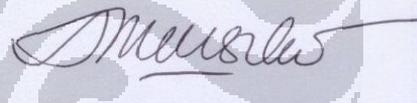
SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2008



Dr. MAKSUM RADJI, M.Biomed

PEMBIMBING I



Dr. AMARILA MALIK, MSi

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana.....

Penguji I : Dr. Arry Yanuar, MS.....

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, MS.....

Penguji III : Dra. Juheini, M.Si.....



*....niscaya Allah akan mengangkat derajat
orang-orang yang beriman diantaramu dan
orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat.....*

(QS. Al.Mujadilah: 11)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan Nikmat dan Karunia yang telah diberikan kepada hambaNya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini serta Shalawat dan Salam kepada Rasulullah SAW yang telah memberikan keteladanan dalam perjuangan menuntut ilmu.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Maksum Radji, M.Biomed selaku Pembimbing I yang dengan sabar dan sepenuh hati memberikan bimbingan, ilmu dan semangat dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Dr. Amarila Malik, MSi selaku Pembimbing II yang dengan sabar membimbing, memberikan ilmu, semangat dan dukungan moril serta materiil selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Maksum Radji, M.Biomed selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberi kesempatan dan kemudahan pada penulis selama masa pendidikan dan penelitian berlangsung.
4. Ibu Dr. Atiek Soemiati, MSi selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi FMIPA UI yang telah memberikan ilmu, kesempatan, kemudahan dan fasilitas selama penelitian berlangsung.

5. Ibu Rosalina (alm) dan Ibu Dr. Berna Elya selaku pembimbing akademik yang telah membimbing dan memotivasi penulis dalam menyelesaikan pendidikan.
6. Segenap staf pengajar, karyawan serta Laboran Departemen Farmasi khususnya Staf Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi FMIPA UI, Mba Catur dan Mas Tri yang banyak memberikan bantuan dan kemudahan kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian.
7. Rekan-rekan Farmasi 2004, khususnya Ajit, Yayuk, Elva, Tri, Diah, Tyas, Anglia, Novi, Femi, Luci serta rekan-rekan seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi UI atas persahabatan, doa, dukungan dan semangat kepada peneliti.
8. Saudari-saudari di kos Ibu Hj. Sukaya, Bu Halimah, Mba Diah, Mba Indah, Mba Siska, Mba Chain atas cinta dan hangatnya keluarga.
9. Kakak tersayang Mas Bagus Pamungkas dan mba Ratnasari atas seluruh doa dan dukungan kepada penulis.
10. Khusus kepada Bapak dan Ibu tercinta, Anugerah Terindah dalam hidup penulis, atas segala cinta, kasih sayang, kesabaran, motivasi, keteladan dan doa yang diberikan kepada penulis.
11. Seluruh pihak yang telah membantu, memberi doa dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari banyak kekurangan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran demi perbaikan di masa mendatang, sangat penulis harapkan.

Penulis

2008

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction (PCR) telah digunakan untuk mendeteksi *Salmonella* dalam sampel makanan dan minuman. Primer yang digunakan didesain berdasarkan gen *invA* spesifik *Salmonella* untuk amplifikasi. Dua puluh satu sampel dikoleksi dari pedagang kaki lima di Jalan Margonda Raya Pondok Cina Depok dari bulan Maret 2008 hingga pertengahan April 2008. Persiapan sampel sebelum PCR, meliputi langkah prapengayaan dalam *Buffered Peptone Water* dan diikuti ekstraksi DNA menggunakan metode *boiling*. Dari hasil ekstraksi DNA, fragmen berukuran 244 pb diamplifikasi dengan PCR. Sampel juga diuji menggunakan metode kultur standar untuk mengkonfirmasi hasil pengujian sampel dengan metode PCR. Batas uji deteksi metode PCR dalam penelitian ini adalah $2,85 \times 10^6$ CFU/ml. Sebanyak empat dari dua puluh satu sampel terdeteksi mengandung *Salmonella* dengan metode PCR, tiga diantaranya tidak terdeteksi dengan metode kultur standar dan satu sampel lainnya terdeteksi dengan metode kultur standar yang dilanjutkan metode PCR. Diharapkan penelitian ini dapat bermanfaat untuk pengembangan metode deteksi *Salmonella* yang mudah, cepat dan dapat dipercaya pada sampel makanan dan minuman.

Kata Kunci: *Salmonella*, PCR, *boiling*, primer *InvA*, metode kultur standar
x + 116 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi : 56 (1980-2008)

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction had been used to detect Salmonella in samples of foods and beverages. Suitable primers which are used were designed based on specific gene *invA* of Salmonella for amplification. Twenty one samples were collected from street food in Margonda Street, Pondok Cina Depok from March 2008 to the mid April 2008. A pre PCR sample preparation including a pre enrichment step in Buffered Peptone Water and followed by DNA extraction by boiling method has been conducted. From extracted DNA, a 244 bp fragment was amplified by PCR. The samples were simultaneously examined by Culture Standard Method to confirm the result of PCR method. The detection limit of PCR method that used in this study are $2,85 \times 10^6$ CFU/ml. Four out of twenty one samples were detected Salmonella by PCR but three of them were not detected by Culture Standard Method and one another was detected by Culture Standard Method which is followed by PCR method. This study is expected to be a useful method that is simple, rapid, and reliable for the development of Salmonella detection in foods and beverages samples.

Keywords : Salmonella, PCR, boiling, primer *invA*, metode kultur standar
x + 116 pages, figures, tables, appendixs

Bibliography : 56 (1980-2008)

DAFTAR ISI

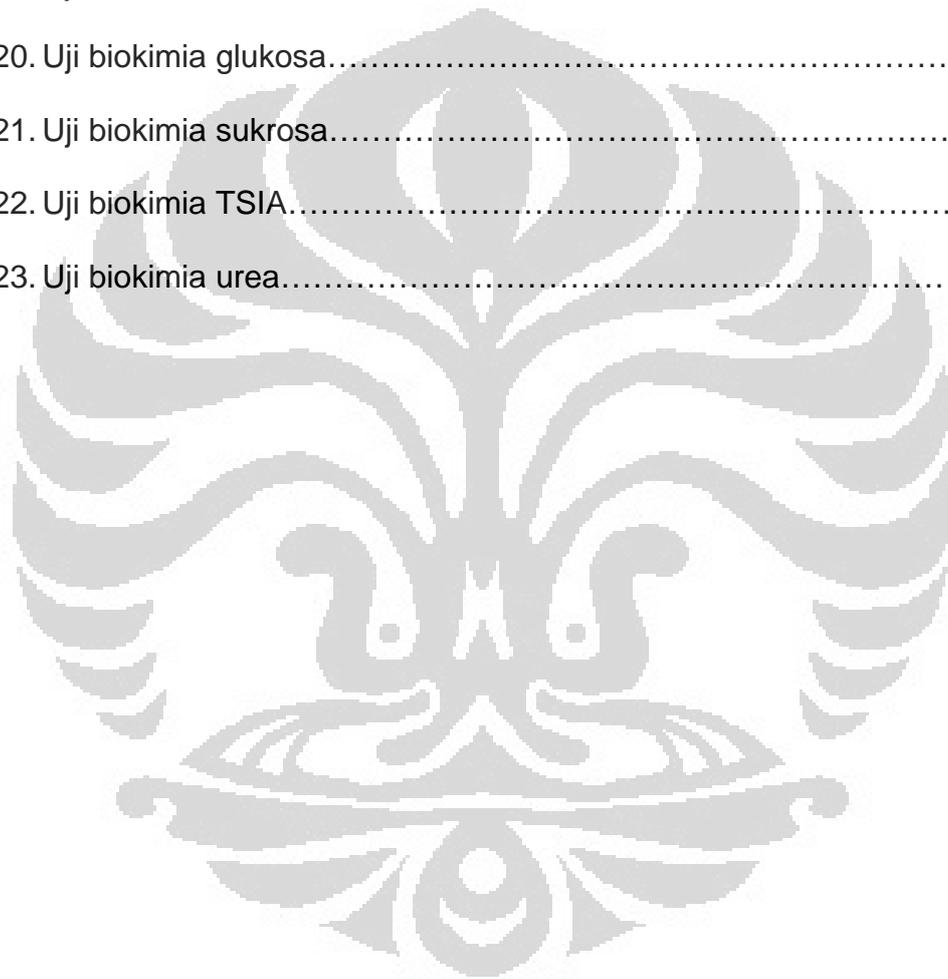
	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. <i>Salmonella</i>	6
B. Gen <i>InvA</i> Pengkode Sifat Invasi <i>Salmonella</i>	12
C. Makanan yang Terkontaminasi <i>Salmonella</i>	15
D. Persiapan Cetakan DNA dari Sampel Makanan untuk PCR.....	17
E. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	19
F. Elektroforesis Gel Agarose.....	24
G. Identifikasi <i>Salmonella</i> dengan Metode Kultur Standar.....	25

BAB III. BAHAN, ALAT DAN CARA KERJA.....	29
A. Lokasi.....	29
B. Bahan.....	29
C. Alat.....	33
D. Cara Kerja.....	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	44
A. Hasil.....	44
B. Pembahasan.....	45
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	68
A. Kesimpulan.....	68
B. Saran.....	68
DAFTAR ACUAN	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Salmonella typhi</i> dengan pewarnaan gram negatif.....	79
2. Makanan dan minuman yang dijual pedagang kaki lima di Jalan Margonda Raya, Pondok Cina, Depok.....	79
3. Depo Penyimpanan es batu.....	80
4. Mesin PCR	80
5. Mikrosentrifus berpendingin.....	81
6. Alat Mikrosentrifus Minispin.....	81
7. Alat Elektroforesis Gel Agarosa.....	82
8. UV Transluminator.....	82
9. Skema Plasmid <i>Salmonella</i> yang mengandung locus <i>inv</i> dan terdapat gen <i>invA</i>	83
10. Skema Polymerase Chain Reaction (PCR).....	83
11. Etidium Bromida.....	84
12. Hasil deteksi <i>Salmonella</i> dengan primer <i>invA</i> menunjukkan amplicon pada elektroforesis gel agarosa.....	85
13. Hasil deteksi <i>Salmonella</i> dengan primer <i>invA</i> menunjukkan amplicon sekitar 244 pb (1-12)	86
14. Hasil deteksi <i>Salmonella</i> dengan primer <i>invA</i> menunjukkan amplicon sekitar 244 pb (13-21)	87

15. Koloni <i>Salmonella</i> dalam <i>Salmonella Shigella</i> Agar.....	88
16. Sampel SCP pada Agar <i>Salmonella Shigella</i>	88
17. Sampel SCP2 setelah diisolasi kembali pada Agar <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	89
18. Kontrol Positif <i>Salmonella typhi</i>	89
19. Uji biokimia laktosa.....	90
20. Uji biokimia glukosa.....	90
21. Uji biokimia sukrosa.....	91
22. Uji biokimia TSIA.....	91
23. Uji biokimia urea.....	92



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan Bakteri <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> menggunakan metode biokimia.....	94
2. Pasangan Primer yang Telah Diuji untuk Identifikasi <i>Salmonella</i>	95
3. Rentang Efisiensi Pemisahan pada Gel Agarosa.....	96
4. Penentuan Angka Kuman.....	96
5. Sumber, Lokasi dan Waktu Pengambilan Sampel.....	97
6. Hasil Metode Kultur Standar Sampel.....	99

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara Pembuatan Reagen dan Dapar yang Digunakan dalam Penelitian.....	104
2. Komposisi Medium	107
3. Perhitungan Penentuan Angka Kuman.....	110
4. Komposisi dan Perhitungan Larutan yang Digunakan pada proses PCR	111
5. Skema Kerja Pengujian Sampel.....	113
6. Penyiapan Cetakan DNA <i>Salmonella</i> dalam makanan dan minuman dengan metode <i>boiling</i>	114
7. Skema Metode kultur Standar Bakteri <i>Salmonella</i> dari Sampel Makanan.....	116

BAB I

PENDAHULUAN

I. LATAR BELAKANG

Penanganan makanan oleh manusia mulai dari pemanenan hasil tanaman dan pemotongan hewan untuk konsumsi manusia, memberikan peluang bagi mikroorganisme untuk mengkontaminasi makanan. Praktek yang tidak bersih dari pengolahan makanan, kondisi pekerjaan yang tidak higienis, penyimpanan, pendinginan dan prosedur penyiapan yang tidak sempurna dapat meningkatkan kontaminasi bakteri patogen (1).

Makanan yang terkontaminasi dapat menjadi sumber bagi penyakit infeksi seperti demam tifoid, kolera, dan disentri. Bakteri dapat menyebar melalui feses dan melewati rute oral dengan air minum yang terkontaminasi feses manusia maupun feses hewan. Penyakit infeksi seperti kolera dan demam tifoid merupakan penyakit utama pada negara berkembang. Pada beberapa negara maju penyakit ini umumnya diderita oleh wisatawan yang kembali dari daerah endemik. Meskipun wisatawan tidak meminum air minum yang tidak higienis, seringkali kuman menyebar melalui makanan termasuk sayur dan buah-buahan yang dicuci dengan air yang terkontaminasi (2).

Salmonella merupakan bakteri patogen utama yang mengkontaminasi makanan (3). Berdasarkan hasil analisis kuantitatif yang dilakukan oleh *Centers for Disease Control and Prevention United State* pada tahun 2000,

diperkirakan bahwa penyakit yang disebabkan oleh kontaminasi makanan di Amerika Serikat mencapai 76 juta penderita penyakit infeksi, sebanyak 325.000 penderita perlu perawatan rumah sakit, dan angka kematian mencapai 5000 tiap tahunnya. Kuman patogen yang diketahui, diperkirakan menyebabkan 14 juta penderita penyakit infeksi, sebanyak 60.000 penderita perlu perawatan rumah sakit dan angka kematian mencapai 1800 tiap tahun. Tiga kuman patogen *Salmonella*, *Listeria*, *Toxoplasma* bertanggung jawab menyebabkan 1500 kematian tiap tahun (4). Di negara berkembang, kasus demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella* dilaporkan sebagai penyakit endemis dimana 95% merupakan kasus rawat jalan sehingga insidensi yang sebenarnya adalah 15-25 kali lebih besar dari laporan rawat inap di rumah sakit. Di Indonesia kasus ini tersebar secara merata di seluruh propinsi dengan insidensi di daerah pedesaan 358/100.000 penduduk/tahun dan di daerah perkotaan 760/100.000 penduduk/tahun atau sekitar 600.000 dan 1,5 juta kasus per tahun (5). Penelitian yang dilakukan Anita N pada tahun 2002 di Bogor menunjukkan penemuan *Salmonella paratyphi* A pada 25%-50% sampel minuman yang dijual di kaki lima. Bakteri ini mungkin berasal dari es batu yang tidak dimasak terlebih dahulu (6).

Pemeriksaan pada makanan untuk menguji keberadaan *Salmonella* pada makanan selalu dilakukan secara rutin di seluruh dunia. Metode Kultural Standar untuk mendeteksi *Salmonella* meliputi prapengayaan nonselektif, diikuti pengayaan selektif dan inokulasi pada agar selektif. Koloni yang

diduga *Salmonella* harus diuji dengan biokimia maupun serologi. Metode ini memerlukan waktu selama 3-4 hari untuk mendapat hasil positif (3).

Beberapa metode cepat untuk mendeteksi *Salmonella* telah dikembangkan, salah satunya adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode yang sensitif dan cepat untuk mengamplifikasi gen spesifik dari *Salmonella* sehingga dapat dideteksi dengan Gel Elektroforesis (3). Selama beberapa tahun, teknik PCR digunakan untuk menganalisa struktur DNA dan RNA, untuk tujuan kloning dan sekuensing serta dikembangkan untuk diagnosa dan diaplikasikan pada diagnosa klinik dan forensik (7). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa PCR berhasil digunakan untuk mendiagnosa keberadaan bakteri *Salmonella* pada sampel air, makanan dan sampel klinik (8).

Salmonella memiliki gen spesifik yang dapat memungkinkan *Salmonella* menginvasi sel intestinal inangnya dan masuk ke dalam peredaran darah inang (9). Pada karakterisasi kromosom *Salmonella* terdapat lokus *inv* yang penting untuk invasi *Salmonella* dalam kultur sel epitel. Salah satu dari 15 gen yang terdapat dalam lokus *inv* adalah *invA* yang berperan pada invasi bakteri (10). Primer Oligonukleotida telah disintesis berdasarkan sekuen DNA gen *invA* yang telah dipublikasikan. Beberapa percobaan yang telah dilakukan untuk menguji spesifitas primer *invA* yang disusun oleh Chiu dan Ou pada tahun 1996, menunjukkan bahwa primer *invA* spesifik untuk

Salmonella dan dapat digunakan untuk deteksi *Salmonella* menggunakan PCR (3,9,11).

Berdasarkan informasi tersebut, maka di dalam penelitian ini akan dilakukan identifikasi bakteri *Salmonella* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* pada makanan dan minuman yang diduga terkontaminasi *Salmonella*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan pada uji pemeriksaan untuk dapat mengidentifikasi adanya kontaminasi bakteri *Salmonella* pada produk makanan dan minuman.

Sampel diambil dari makanan dan minuman berupa gado-gado, karedok, rujak, minuman dan jamu yang dijual oleh pedagang kaki lima dan berlokasi di sekitar Jalan Margonda Raya, Kelurahan Pondok Cina, Kecamatan Beji, Depok.

Sebelum dilakukan identifikasi dengan PCR, dilakukan proses prapengayaan dengan menggunakan medium *Buffered Peptone Water* (BPW) untuk menumbuhkan bakteri pada sampel (12). Kemudian dilakukan penyiapan cetakan DNA dari sampel makanan menggunakan metode *Boiling*. Metode ini dipilih karena lebih sederhana lebih cepat dan lebih murah (13). Supernatan yang didapatkan dari persiapan cetakan DNA, digunakan sebagai sampel pada PCR dengan menggunakan primer *invA*.(3,9,14)

Untuk mengkonfirmasi keberadaan bakteri *Salmonella* pada sampel makanan, juga dilakukan deteksi bakteri *Salmonella* menggunakan Metode Kultural Standar. Metode ini meliputi prapengayaan nonselektif menggunakan media *Buffered Peptone Water*, diikuti pengayaan selektif pada media

Selenite Cystein dan inokulasi pada agar selektif *Salmonella-Shigella*. Koloni yang diduga *Salmonella* diuji dengan pengujian biokimia meliputi pengujian dengan agar *Triple Sugar Iron*, Gula-gula, dan Medium Urea (12).

II. TUJUAN PENELITIAN

Mendeteksi bakteri *Salmonella* pada beberapa sampel makanan dan minuman dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan primer *invA* yang spesifik terhadap *Salmonella*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Salmonella*

Morfologi

Salmonella merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang. *Salmonella* memiliki panjang yang bervariasi. Sebagian besar isolat bergerak dengan flagela peritrik (15). *Salmonella* merupakan bakteri anaerob fakultatif dan dapat memfermentasi glukosa serta mereduksi nitrat menjadi nitrit (16).

Klasifikasi

Berdasarkan klasifikasi dalam *Bergey's Manual* edisi kedelapan, *Salmonella* diklasifikasikan sebagai berikut (17):

- Kerajaan : *Plant*
- Divisi : *Protophyta*
- Kelas : *Schizomycetes*
- Ordo : *Eubacteria*
- Famili : *Enterobacteriaceae*
- Genus : *Salmonella*
- Spesies : *S. typhi, S. choleraesuis, S. enteritidis.*

Komposisi basa DNA *Salmonella* terdiri dari 50-52% G+C, mirip dengan *Escherichia*, *Shigella*, dan *Citrobacter*. Bakteri pada genus *Salmonella* satu sama lain dihubungkan dengan sekuen DNA. Genus yang memiliki kemiripan DNA dengan *Salmonella* adalah *Escherichia*, *Shigella*, dan *Citrobacter*. Kemiripan ditemukan melalui taksonomi numerik dan analisis 16S ssRNA (18).

Nomenklatur *Salmonella* pernah menjadi kontroversi karena pada awalnya taksonomi tidak berdasar pada hubungan DNA. Pemberian nama didasarkan pada konsiderasi klinik misalnya *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella abortus-ovis*. Berdasarkan analisis serologi dengan pola The Kauffman-White pada tahun 1946, *Salmonella* dibagi berdasarkan aktivitas fermentasi dengan hasil masing-masing menjadi spesies. Namun, karena nama-nama yang ada sebelumnya (*S. typhi-murium*, *S. cholerae-suis*) tidak menjadi spesies spesifik, maka pemberian nama berdasarkan asal geografi tempat bakteri pertama kali diisolasi seperti *S.london*, *S. panama* dan *S.stanleyville* (18).

Berdasarkan DNA hibridisasi satu spesies dapat dikelompokkan menjadi 7 subspecies. Spesies *Salmonella enterica* memiliki subspecies *enterica I*, *salamae II*, *arizonae IIIa*, *diarizonae IIIb*, *huotena* IV, *bongori V* dan *indica VI* (18). *Salmonella typhi* dan *S. paratyphi* merupakan *Salmonella enterica* subspecies I (16).

Salmonella dapat digolongkan berdasarkan formula antigen untuk diagnosa dan aplikasi identifikasi (18). Antigen *Salmonella* terdiri dari (16,18):

a) Antigen Somatik (O)

Antigen somatik stabil pada pemanasan dan resistan alkohol. Uji *cross-absorption* memisahkan faktor antigen dalam jumlah besar, 67 diantaranya digunakan untuk identifikasi antigen (18). Lebih dari 1400 *Salmonella* yang diisolasi di laboratorium klinik dikelompokkan berdasarkan antigen O sebagai serogroup A, B, C1, C2, D, dan E. Empat serotype *Salmonella* dapat menyebabkan demam enterik, yaitu *Salmonella Paratyphi* (serogroup A), *Salmonella Paratyphi B* (serogroup B), *Salmonella Choleraesuis* (serogroup C1), dan *Salmonella Typhi* (Serogroup D) (15)

b) Antigen Permukaan

Antigen permukaan umumnya ditemukan di genus lain dari bakteri enterik seperti *Escherichia coli* dan *Klebsiella*, namun dapat ditemukan pada genus *Salmonella*. Antigen permukaan dapat menutupi antigen O sehingga bakteri tidak teraglutinasi dengan antisera O. Antigen Vi merupakan antigen permukaan spesifik yang hanya ditemukan pada 3 serovar *Salmonella*, yaitu *Typi*, *Paratyphi* dan *Dublin* (18).

c) Antigen Flagelar (H)

Antigen Flagelar merupakan protein tidak tahan panas. Sel *Salmonella* dengan antisera spesifik flagela memberikan pola aglutinasi yang spesifik (bakteri akan menempel satu sama lain melalui flagella dan dapat dipisahkan dengan pengguncangan). Antibodi antflagela dapat menghentikan pergerakan bakteri dengan berinteraksi dengan flagela (18).

Salmonella dapat menghasilkan tiga jenis penyakit pada manusia, yaitu:

1. Demam Enterik (Demam Tifoid)

Demam Tifoid disebabkan oleh konsumsi air atau makanan yang terkontaminasi oleh *Salmonella Typhi*. Demam tifoid merupakan penyakit endemik di beberapa daerah di Amerika tengah, Afrika dan Asia (17). *Salmonella* serotipe *typhi* secara unik beradaptasi pada manusia, dan manusia pembawa (*carrier*) dapat menjadi sumber organisme ini. Pembawa akan mengekskresi bakteri *Salmonella* dalam periode yang singkat, maupun bersifat kronik yang dapat menyebarkan bakteri ini selama waktu lebih dari 1 tahun (19).

Patogenesis

Masa inkubasi berkisar 10-14 hari (20). Masa inkubasi dipengaruhi oleh banyaknya *Salmonella* yang masuk dalam tubuh (21). Sebanyak 50% orang dewasa menjadi sakit bila menelan sebanyak 10^7 bakteri. Dosis dibawah 10^5

tidak menimbulkan penyakit (22). Bakteri melalui sel intestinal masuk ke dalam aliran darah. Mereka difagositosis namun tidak terbunuh oleh sel fagositosis (23). Antigen permukaan Vi dapat menghambat terbunuhnya bakteri oleh fagositosis. Invasi *S. typhi* pada mukosa usus halus diikuti oleh multiplikasi pada kelenjar limfa mesentrik. Kemudian masuk ke dalam aliran darah dan terjadi bakterimia (20). Pasien mengalami demam yang meningkat bertahap, sakit kepala, nyeri otot, malaise, dan kehilangan semangat selama 1 minggu atau lebih (23). Selama tahap akhir masa inkubasi, organisme berada dan bermultiplikasi pada *Reticulo Endothelial System* (RES) pada sumsum tulang, hati dan limfa serta kelenjar empedu (20). Bakteri dapat dilepaskan dari kantung empedu untuk kembali menginfeksi intestinal, menyebabkan gastroenteritis dan nyeri otot. Pada beberapa pasien, bakteri dapat menyebabkan perforasi dan ulserasi pada dinding usus yang menyebabkan bakteri dari saluran intestinal menuju ke rongga perut, dan menyebabkan peritonitis (23).

Gejala dan Tanda

Gejala utama selama minggu pertama adalah demam yang meliputi malaise, sakit kepala, batuk tidak produktif, konstipasi, nyeri perut, dan konfusi mental. Seringkali terjadi *delirium*, dan *neuropsikiatrik* (20).

Pada minggu kedua, *Salmonella typhi* mulai menyebabkan lesi lokal pada *Peyers patches* (jaringan submukosa Limfoid), dan seringkali terjadi diare.

Tanda fisik seperti bradikardi, *rose spots* pada abdomen maupun *splenomegali* dapat terjadi pada sebagian kecil pasien. Beberapa pasien menunjukkan *leucopenia*. *Salmonella* seringkali berada secara intraseluler dalam makrofag dan dapat melindungi *Salmonella* dari mekanisme antibodi humoral, dan dapat melawan beberapa antibiotik (20).

Komplikasi pada tifoid dapat terjadi selama 2 sampai 5 minggu setelah onset penyakit, meliputi perforasi intestinal, perdarahan intestinal, *myocarditis*, *osteomyelitis* dan meningitis. Kematian dapat terjadi pada 10% pasien yang tidak mendapat antibiotik.

Demam tifoid dapat kambuh setelah kesembuhan pada 10% pasien dengan tingkat keparahan penyakit biasanya lebih ringan dari penyakit awal (20).

2. Septikemia

Septikemia seringkali disebabkan oleh *Salmonella choleraesuis*. Namun, dapat juga disebabkan oleh *Salmonella* serotipe lainnya. Setelah infeksi oral, terjadi invasi pada aliran darah yang menyebabkan lesi pada paru dan tulang, namun tidak terjadi manifestasi pada intestinal. Kultur darah positif (15,19).

3. Enterokolitis

Enterokolitis merupakan manifestasi yang paling umum pada infeksi *Salmonella*. Di Amerika Serikat, *Salmonella typhimurium* dan *Salmonella*

enteritidis merupakan penyebab utama, namun juga dapat disebabkan oleh 1400 *Salmonellae* serotipe grup I. Setelah 8-48 jam infeksi *Salmonella*, terjadi mual, muntah, sakit kepala dan diare dengan sedikit leukosit pada feses. Demam ringan sering terjadi namun, hanya berdurasi selama 2-3 hari (15,19).

B. GEN *InvA* PENGKODE SIFAT INVASI *Salmonella*

Beberapa faktor virulensi dari *Salmonella* adalah Lipopolisakarida (LPS), toksin, motilitas, fimbria adhesi, kapsul polisakarida (Vi antigen), dan faktor invasi. Lipopolisakarida *Salmonella* berperan pada pelekatan, invasi dan replikasi *Salmonella* dalam sel HeLa. Lipopolisakarida juga merupakan inhibitor potensial dari proliferasi dan sintesis antibodi poliklonal oleh Limfosit B. *Salmonella* memiliki toksin yang berperan dalam virulensi *Salmonella* pada sel inang. Toksin tersebut merupakan sitotoksin yang tidak tahan panas dan sensitif tripsin. Motilitas merupakan faktor virulensi yang berhubungan dengan kemotaksis, pelekatan dan invasi *Salmonella* pada sel HeLa. Fimbria merupakan protein tambahan pada permukaan bakteri yang membantu pelekatan pada sel inang dan penting untuk kolonisasi dan infeksi pada jaringan inang. Vi antigen merupakan kapsul polisakarida homopolimer dari N asetilglukosamin, dan menjadi faktor virulensi yang sangat penting karena seringkali ditemukan pada isolat yang berasal dari darah pasien yang menderita demam tifoid. Kapsul polisakarida ini berperan untuk menghindari

fagositosis dari respon imun inang. Dengan adanya kapsul polisakarida, *Salmonella* dapat bertahan dan bermultiplikasi dalam sel makrofag (24).

Invasi dalam sel epitelial mukosa intestinal untuk mencapai aliran darah merupakan langkah awal yang penting dalam patogenesis *Salmonella* (25). Penelitian yang dilakukan oleh Yabuchi, et al pada tahun 1986 tentang interaksi *Salmonella* pada kultur sel epitelial menunjukkan bahwa invasi merupakan proses aktif yang diperlukan untuk kehidupan bakteri. Yabuchi juga menambahkan bahwa ada atau tidaknya Vi antigen kapsul memiliki sedikit pengaruh pada invasi *Salmonella*. Invasi sel HeLa oleh *Salmonella* dapat terjadi dengan adanya pili dan flagel. Pili dapat membentuk jembatan antara bakteri dan mikrofilia sel inang (24).

Beberapa usaha dilakukan untuk mengetahui mekanisme molekuler dan seluler dari invasi *Salmonella* pada kultur sel epitelial. Pertama *Salmonella* berinteraksi dengan permukaan sel inang dan menyebabkan degenerasi lokal dari mikrofilia yang diikuti dengan pengkerutan membran dan akumulasi aktin yang menyebabkan masuknya *Salmonella* melalui membran yang mengkerut. Penelitian oleh Alpuche-Aranda tahun 1994 menunjukkan bahwa *Salmonella* menginduksi makropinositosis pada daerah membran yang mengkerut sehingga terbentuk vakuola yang lebar yang dapat membawa *Salmonella* (24).

Beberapa gen yang berhubungan dengan invasi telah diidentifikasi menggunakan pendekatan genetika molekuler. Karakterisasi strain *Salmonella* yang tidak dapat memasuki sel inang diikuti dengan identifikasi lokus *inv* yang sangat dibutuhkan oleh *Salmonella* untuk menginternalisasi ke

dalam kultur sel nonfagositosis. Survei secara luas pada 100 serovar menunjukkan bahwa lokus *inv* berada pada seluruh isolat yang diamati. Sekuensing nukleotida dan analisis fungsional pada daerah *inv* telah mengidentifikasi sedikitnya 14 gen yaitu: *invH*, *invF*, *invG*, *invE*, *invA*, *invB*, *invC*, *invI*, *invJ*, *spaO*, *spaP*, *spaQ*, *spaR*, *spaS* (gambar 9) (26). Semua gen kecuali *invB* diperlukan untuk masuknya *Salmonella* ke dalam kultur sel epithelium. Mutasi pada semua gen kecuali *invH* tidak memberikan efek yang berarti pada kemampuan *Salmonella* menempel pada sel inang. Hal ini menunjukkan bahwa penempelan dan invasi *Salmonella* pada sel inang merupakan kejadian yang terpisah (26). Mutasi pada *invA* secara signifikan mengurangi kemampuan *Salmonella* untuk masuk dalam kultur sel epithelium, tanpa memberikan efek yang signifikan pada kemampuan *Salmonella* untuk menempel pada sel yang sama. *invA* ditemukan dan berfungsi pada sebagian besar strain *Salmonella* yang virulen. Protein *invA* diprediksi memiliki berat molekul 71.000 dengan struktur sekunder dengan membran protein integral yang terdiri dari dua domain, yaitu ujung amino hidrofobik dan ujung karbon hidrofilik yang terletak pada sitoplasma (10).

Beberapa oligonukleotida primer untuk PCR telah disintesis untuk mendeteksi gen-gen spesifik *Salmonella* yang dapat dilihat pada tabel 2 (9). Oligonukleotida primer yang digunakan dalam penelitian ini didesain oleh Chiu dan Ou pada tahun 1996 berdasarkan sekuen DNA gen *invA* spesifik untuk genus *Salmonella* (11). Pengujian sensitifitas dan spesifitas oligonukleotida pada isolat bakteri non-*Salmonella* (*Shigella sonnei*,

S.flexeneri, *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus pneumonia*) dan isolat bakteri *Salmonella* (*Salmonella* serovar *Typhimurium*, *Schwarzengrund*, *Agona*, *Derby*, *Kaapstad*, *massenya*, *Abortusovis*, *Clackamas*, *Cholaresuis*, *Infatis*, *Virchow*, *Thompson*, *Muenchen*, *Blockley*, *Newport*, *Typhi*, *Dublin*, *Panama*, *Enteritidis*, *Anatum*, *Weltevreden*, *Gallinarum-Pullorum*, dan *Sendaï*) menunjukkan seluruh isolat non-*Salmonella* tidak menghasilkan ampikon *invA* sedangkan seluruh isolat *Salmonella* memproduksi ampikon *invA* (11). Beberapa percobaan yang telah dilakukan untuk menguji spesifitas primer *invA* yang disusun oleh Chiu dan Ou pada tahun 1996 menunjukkan bahwa primer *invA* yang tersusun dari sekuen *invA1* ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT dan *invA2* AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT spesifik untuk *Salmonella* dan dapat digunakan untuk deteksi *Salmonella* menggunakan PCR (3,9,11,14).

C. MAKANAN YANG TERKONTAMINASI *Salmonella*

Sayuran dan buah-buahan sangat mudah terkontaminasi oleh organisme dari tanah, hewan, udara, air irigasi, dan peralatan yang digunakan untuk mengangkut, transportasi, menyimpan dan memproses sayuran dan buah-

buah. Patogen seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Entamoeba histolytica* dan berbagai virus dapat bertransmisi pada permukaan sayur dan buah. Akan tetapi, kulit dari sebagian besar sayuran dan buah mengandung wax dan melepaskan substansi antimikroba yang dapat menghambat invasi mikroba dalam jaringan internal (1).

Daging hewan yang berasal dari rumah pemotongan hewan mengandung berbagai jumlah dan jenis mikroorganisme pada perut, feses, kulit dan kuku, serta beberapa jaringan. Meskipun telah dilakukan inspeksi pada daging, tidak dapat menggaransi bahwa daging terbebas dari parasit. Meskipun setelah pemotongan hewan, daging digantung pada ruang pendingin, mikroorganisme masih dapat merusak daging. Lebih dari 20 genus bakteri ditemukan pada daging unggas yang dikeringkan, dan kesalahan penanganan daging unggas di restoran dapat menyebabkan infeksi karena makanan. Sedikitnya setengah dari infeksi disebabkan oleh *Salmonella* dan seperempatnya karena *Clostridium perfringens* dan *Staphylococcus aureus*. Pembekuan gagal untuk menghilangkan kontaminasi *Salmonella* pada daging unggas (1)

Telur memiliki cangkang yang keras sehingga kemungkinan akan terbebas dari kontaminasi mikroorganisme. Namun, karena cangkang telur memiliki pori, *Pseudomonas* dan beberapa bakteri dapat melintasi pori pada cangkang dan menginfeksi telur. *Salmonella* juga dapat hidup pada cangkang telur dan dapat mengkontaminasi pada telur yang pecah maupun dapat terdeposit dengan pecahan cangkang pada makanan. CDC melaporkan

bahwa 1 dari setiap 10.000 telur mengandung *Salmonella* di dalam cangkangnya (1)

Ikan segar banyak mengandung mikroorganisme. Beberapa spesies dari bakteri enterik dan clostridia, enterovirus dan cacing parasit umum ditemukan pada ikan segar. Banyak dari mikroorganisme ini bertahan pada pengepakan ikan pada es, terutama jika ikan dikemas terlalu rapat sehingga dapat meningkatkan kontaminasi pada ikan. Kerang, seperti tiram dan remis mengandung banyak mikroorganisme. Tiram yang mentah dapat mengandung *Salmonella typhimurium* dan beberapa *Vibrio cholerae*. Diantara jenis *crustacea*, udang merupakan jenis yang paling sering terkontaminasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa setengah dari udang yang berada di pasar mengandung 1 juta bakteri (lebih dari 5000 coliform) per gram. Namun perlu diingat bahwa adanya kandungan mikroorganisme pada *seafood* tidak selalu berarti bahwa *seafood* terkontaminasi oleh patogen. Pada kenyatannya, bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dapat memproduksi *hydrogen peroxide* yang dapat menghambat pertumbuhan organisme lain pada *seafood* (1).

D. PERSIAPAN CETAKAN DNA DARI SAMPEL MAKANAN UNTUK PCR

Beberapa faktor yang terkandung dalam makanan dapat menjadi inhibitor dalam PCR. Oleh karena itu, menghilangkan substansi penghambat merupakan langkah utama dalam mempersiapkan sampel untuk identifikasi bakteri patogen pada makanan dengan metode PCR (3)

Untuk mendeteksi spesies *Salmonella* dari sampel makanan diperlukan prapengayaan pada medium cair yang tidak selektif. Dengan menggunakan peralatan dan teknik yang aseptik, sampel dimasukkan dalam labu Erlenmeyer steril. Berat yang dapat merepresentasikan sampel berkisar 25 gram. Dengan menggunakan *orbital shaker*, sampel dihomogenisasi dengan *Buffered Peptone Water* (BPW) sebanyak sembilan kali berat atau volume sampel. Kemudian homogenat diinkubasi pada 37°C selama 18± 2 jam (12).

Beberapa metode telah dijelaskan dapat digunakan untuk menyiapkan cetakan DNA dari sampel makanan untuk PCR, antara lain yaitu:

1. *Boiling*

Metode ini menggunakan temperatur tinggi untuk mendenaturasi DNA plasmid dan genomik dari bakteri. Bakteri yang dimasukkan dalam air mendidih menyebabkan sel lisis dan denaturasi DNA. Kemudian larutan didinginkan sehingga menyebabkan plasmid DNA berikatan kembali dan tetap berada dalam larutan sedangkan DNA genomik mengendap. Kemudian suspensi bakteri disentrifugasi dan supernatan yang mengandung DNA plasmid dipindahkan (27,28).

2. *Alkaline extraction*

Pertama, sel bakteri dilisis dalam larutan yang mengandung *sodium dodesil sulfat* (SDS), yaitu detergen yang dapat mendenaturasi protein dan merusak membran sel. Kemudian ditambahkan *sodium hydroxide* (NaOH) yang membuat suasana larutan menjadi sangat basa dan menyebabkan DNA

plasmid dan genomik bakteri terdenaturasi menjadi untai tunggal. Suasana basa larutan kemudian dinetralkan menggunakan potassium acetate (KAc). DNA genomik yang sangat besar tidak dapat berikatan kembali membentuk untai ganda sehingga membentuk endapan. DNA plasmid yang kecil dapat berikatan kembali ketika KAc ditambahkan sehingga tetap terlarut dalam larutan. KAc juga mengendapkan SDS dan sebagian besar protein dan lemak yang berikatan dengannya. Kemudian suspensi disentrifugasi dan supernatant yang mengandung plasmid DNA dipindahkan (27,28).

3. *Immunomagnetic Separation* (IMS)

IMS merupakan teknik yang sangat baik untuk mengekstraksi bakteri dari sampel makanan. Bakteri secara spesifik dipisahkan dari makanan, dan dapat digunakan sebagai sampel untuk PCR dengan sedikit atau tidak ada DNA nonspesifik dengan faktor interfering. Selama IMS, bakteri target dari sampel prapengayaan secara spesifik ditangkap oleh manik-manik yang dilapisi antibodi anti-*Salmonella*. Kompleks bakteri dan manik-manik dipisahkan dengan menggunakan magnet dan dicuci beberapa kali untuk menghilangkan debris makanan dan organisme lain (3)

E. *Polymerase Chain Reaction*

Adalah metode sintesis asam nukleat secara *in vitro* dengan menggunakan segmen DNA yang secara spesifik dapat direplikasi. Primer

dihybridasi dengan sekuen target dan diarahkan hingga sintesis DNA oleh DNA Polimerase berjalan diantara kedua primer (29)

Dengan PCR, sejumlah besar fragmen DNA spesifik dapat diproduksi dari sedikit molekul DNA cetakan. Teknik ini juga dapat digunakan untuk beberapa sampel pada waktu yang sama dan membutuhkan waktu yang cepat (29).

Oleh karena untai yang disintesis sebelumnya dapat digunakan sebagai DNA cetakan untuk siklus selanjutnya, maka dihasilkan akumulasi dari fragmen spesifik DNA dengan jumlah 2^n dimana n adalah jumlah siklus amplifikasi yang dilakukan (29)

Selama beberapa tahun, teknik PCR digunakan untuk menganalisa struktur DNA dan RNA, untuk tujuan kloning dan sekuensing serta dikembangkan untuk diagnosa dan diaplikasikan pada diagnosa klinik dan forensik (7,29). Penelitian yang dilakukan Haque,dkk pada tahun 1999 menunjukkan bahwa teknik PCR dapat mendeteksi *Salmonella* dengan konsentrasi 5 bakteri/mL pada sampel darah pasien yang diduga menderita demam tifoid (30). Sensitivitas yang tinggi pada teknik amplifikasi DNA menyebabkan teknik ini menjadi pilihan metode untuk deteksi DNA mikroba pada spesimen klinik (31)

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen dasar, yaitu (32):

1. DNA utas ganda yang mengandung daerah yang akan diamplifikasi sebagai DNA target.

2. Dua Oligonukleotida primer yang menentukan bagian pada DNA yang akan diamplifikasi. Masing-masing oligonukleotida harus berkomplemen pada sekuen DNA yang tepat dan mengapit DNA target yang akan diamplifikasi.
3. Enzim DNA polymerase yang stabil pemanasan. Digunakan *Taq Polymerase* yang didapat dari *Thermus aquaticus*
4. 4 macam Deoksiribonukleotida trifosfat, yaitu dATP, dTP, dCTP dan dTTP.

Reaksi PCR membutuhkan pengulangan siklus yang terdiri dari 3 langkah, yaitu (32) (gambar 10):

1. Denaturasi utas ganda DNA dengan menggunakan pemanasan hingga terpisah menjadi DNA untai tunggal. Pemanasan ini membutuhkan suhu 95°C
2. Pelekatan primer pada DNA target sebagai sekuen komplemennya. Pada tahap ini suhu diturunkan hingga mencapai suhu 50°C sehingga terjadi pelekatan primer pada DNA cetakan
3. Sintesis DNA. Pada tahap ini terjadi ketika temperatur DNA dinaikkan pada temperatur 70°C sebagai temperatur optimal *Taq DNA Polimerase*. *Taq DNA Polimerase* digunakan karena tidak terjadi kerusakan pada tahap denaturasi yang membutuhkan temperatur mencapai 95°C.

Penggunaan suhu tinggi dapat meningkatkan spesifitas pada reaksi PCR karena dapat menurunkan hibridisasi primer pada DNA non target.

Optimasi PCR

1. Sekuen Target

Sekuen target dapat menyediakan sensitifitas dan spesifitas meskipun sekuen target berada pada elemen genetik yang tidak stabil jika keberadaan elemen berhubungan dengan virulensinya, karena gen pengkode sifat virulensi yang tidak stabil dapat hilang selama isolasi. Setting uji amplifikasi gen pengkode virulensi dilakukan segera setelah isolasi atau langsung dari sampel (33)

2. Primer

Primer memiliki 15-30 nukleotida dengan komposisi basa 45-55 % GC. Panjang lengan dan komposisi GC dapat mempengaruhi temperatur pada langkah pelekatan. Primer dengan panjang lebih dari 15 nukleotida memastikan bahwa primer tidak akan berlekatan dengan DNA nontarget.

Konsentrasi primer yang terlalu rendah memberikan hasil reaksi yang buruk, namun konsentrasi yang terlalu tinggi memberikan spesifitas yang rendah. Konsentrasi primer yang tinggi juga menyebabkan tingginya kadar primer dimer buatan. Akumulasi primer dimer buatan dapat menurunkan sensitifitas uji ini akibat kontaminasi (34).

Konsentrasi primer 0,1 μM cukup untuk sebagian besar sistem meskipun rentang konsentrasi 0,05-1 μM perlu dieksplorasi untuk mengoptimalkan sistem.

3. Temperatur

Temperatur denaturasi sebaiknya cukup tinggi untuk dapat mendenaturasi DNA target dengan sempurna. Temperatur tergantung pada kandungan GC dan panjang lengan target. Meskipun denaturasi terjadi pada hitungan detik, biasanya diperlukan waktu 1 menit pada suhu 94°C untuk memastikan tercapainya temperatur yang benar (34).

Temperatur pada langkah pelekatan seharusnya digunakan temperatur maksimal dimana terjadi hibridisasi. Hal ini dipengaruhi oleh panjang lengan, kandungan GC, konsentrasi primer serta konsentrasi garam (KCl dan MgCl_2) dan DNA Polimerase. Temperatur pelekatan yang tinggi dapat mengurangi hibridisasi dan pemanjangan sekuen nonspesifik. Meskipun konsentrasi pelekatan primer 0,1-1 μM , untuk memastikan tercapainya temperatur yang tepat dilakukan selama 0,5-2 menit (34)

Tahap pemanjangan dilakukan pada suhu 72°C , yang merupakan temperatur optimum untuk DNA Polimerase termofilik. Umumnya polimerase memiliki kecepatan 400 nukleotida permenit, sehingga diperlukan waktu 1 atau 2 menit untuk pemanjangan target (34)

DNA Polimerase termofilik menunjukkan aktivitas pada suhu $50-70^{\circ}\text{C}$ sehingga pelekatan dan pemanjangan terjadi secara lengkap pada suhu

tersebut. Banyaknya siklus yang diperlukan dibatasi oleh jumlah minimum yang diperlukan untuk mendeteksi target pada kadar rendah. Siklus tambahan tidak diperlukan karena dapat menyulitkan deteksi target spesifik (34)

4. Reagen dan Konsentrasi Optimal

Konsentrasi garam (KCl dan $MgCl_2$) dapat mempengaruhi tempertaur pada tahap pelekatan. Konsentrasi garam juga dapat mempengaruhi aktivitas DNA Polimerase. Konsentrasi optimal KCl (0-50 mM) tergantung pada pemilihan DNA Polimerase. Sekuen target yang lebih panjang dapat teramplifikasi lebih efisien dengan konsentrasi KCl yang rendah.

Konsentrasi optimal $MgCl_2$ bervariasi pada 0 - 4 mM. Deoksinukleotda trifosfat mengikat $MgCl_2$ sehingga mempengaruhi konsentrasi $MgCl_2$. Total konsentrasi dNTP yang digunakan adalah 0,8 mM.

Konsentrasi DNA Polimerase (0,5-5,0 unit/sampel) harus cukup tinggi sehingga dapat memberikan pemanjangan DNA secara efisien. Namun konsentrasi DNA Polimerase yang tinggi dapat meningkatkan amplifikasi sekuen non target. Oleh karena itu, kadar DNA Polimerase dibatasi oleh jumlah yang dibutuhkan (34)

F. KTROFORESIS GEL AGAROSA

Elektroforesis merupakan prosedur yang telah digunakan secara luas untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan molekul biologi. Dalam biologi molekuler, aplikasi elektroforesis digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjang pasangan basa DNA. Elektroforesis merupakan perubahan perpindahan partikel bermuatan akibat respon pada medan listrik. Banyak makromolekul biologi bermuatan sehingga dapat dipisahkan dengan elektroforesis misalnya DNA, RNA yang memiliki kekuatan negatif pada pH netral karena adanya gugus fosfat pada *backbone*. Elektroforesis asam nukleat cukup mudah karena muatan pada asam nukleat sebanding dengan ukuran molekul (35)

Fraksi terbentuk ketika makromolekul biologi dielektroforesis pada medium gel. Gel membentuk matriks (penyaring molekuler) yang menghalangi perpindahan makromolekul berdasarkan pada tingkatan ukuran. Fragmen yang lebih kecil akan bermigrasi cepat melewati gel dibandingkan fragmen yang lebih besar (35)

Matriks gel harus inert sehingga tidak berinteraksi dengan molekul yang akan dipisahkan. Matriks gel yang sering digunakan adalah poliakrilamid dan agarosa (35)

Gel agarosa mudah untuk dipersiapkan dan dijalankan serta dapat memisahkan molekul DNA dengan interval ukuran dari ratusan pasangan basa hingga 50.000 pasangan basa/ gel agarose dilarikan pada billik gel horizontal dalam dapar dan dilarikan pada tegangan 1-5 V/cm. Selama elektroforesis, arah molekul DNA paralel pada medan listrik (35)

Untuk mempermudah pada pengamatan DNA, digunakan perwarna yang dapat berfluoresensi. Etidium Bromida merupakan molekul planar yang berinteraksi dengan molekul DNA (gambar 11). Konsentrasi Etidium Bromida pada fragmen DNA akan berfluoresensi ketika terpapar sinar UV (35).

G. IDENTIFIKASI *Salmonella* DENGAN METODE KULTUR STANDAR

Pada sampel yang berasal dari pasien dengan infeksi kronik maupun sampel dari lingkungan, angka *Salmonella* sangat kecil dibandingkan dengan angka dari bakteri lain. Sampel ini perlu diinokulasikan pada media pengayaan selektif untuk mengoptimalkan penemuan *Salmonella*. Namun, pengayaan pada media selektif pada beberapa sampel tidak memberikan hasil yang baik untuk mendeteksi *Salmonella*. Pada sampel makanan yang telah dikeringkan, dipanaskan, maupun diradiasi, diperlukan langkah prapengayaan pada medium nonselektif untuk mengoptimalkan penemuan *Salmonella*, karena pada sampel tersebut mungkin terdapat *Salmonella* namun dalam keadaan lemah. Pada keadaan ini, meskipun *Salmonella* masih dapat aktif kembali pada kondisi yang baik, namun dapat dengan mudah terbunuh pada lingkungan yang keras pada media pengayaan selektif. Media prapengayaan yang sering digunakan adalah *Lactose Broth* (LB) dan *Buffered Peptone Water* (BPW). Beberapa penelitian yang telah dilakukan Waltman pada tahun 2000 menunjukkan bahwa BPW lebih baik digunakan dibandingkan LB untuk mengisolasi *Salmonella* (36).

Ada beberapa media pengayaan selektif yang sering digunakan, yaitu *Tetrathionate*, *Selenite* dan *Rappaport-Vasiliadis*. Rasio inokulasi yang sering digunakan dalam kaldu pengayaan *Tetrathionate* dan *Selenite* adalah 1:100 dan 1:1000 untuk kaldu *Rappaport-Vasiliadis* (36).

Media pengayaan ini kemudian di inokulasi pada media selektif. Media yang sering digunakan adalah media selektif untuk *Salmonella*, seperti *Salmonella Shigella Agar* (SSA), agar *bismuth sulfite*, medium *Hektoen enteric*, agar *brilian green*, dan *Xylose-Lisine-Deoxycholate Agar* (XLD). Semua media ini mengandung komposisi yang selektif dan diferensial dan tersedia secara komersial (18). Pada media SSA, Gram (+) ditekan pertumbuhannya dengan adanya *Brilian Green* dan garam empedu. Thiosulfate dan ion besi dapat digunakan untuk mengetahui produksisulfida oleh *Salmonella*, yang diindikasikan dengan adanya pigmen hitam. Laktosa digunakan sebagai reaktan untuk menunjukkan adanya bakteri coliform dengan *netral red* sebagai indikator pH. Organisme yang memfermentasi laktosa akan membentuk koloni berwarna merah/ merah muda, organisme yang tidak emfermentasi laktosa akan membentuk koloni sewarna media (*transluent*), dan organisme yang membentuk *hydrogen sulfide* (H₂S) akan membentuk pigmen hitam (33). Pada media XLD, *Salmonella* memfermentasi *Xylose*, mendekarboksilasi *Lysine*, dan memproduksi H₂S serta membentuk koloni berwarna merah dengan warna hitam dibagian tengah. Pada media BGA, *Salmonella* membentuk koloni berwarna merah dengan dikelilingi warna merah cerah (12).

Koloni yang diduga *Salmonella* yang tumbuh pada medium selektif kemudian diuji dengan uji biokimia untuk mengkararakteristik *Salmonella*. Perbedaan uji Biokimia antara *Salmonella*, *Shigella* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 1 (17). Karakteristik sebagian besar Strain *Salmonella* Subspesies I (18):

- a) Dapat bergerak
- b) Bakteri Gram negatif
- c) Laktosa negatif
- d) Menghasilkan gas dan asam dari glukosa, manitol, maltosa dan sorbitol.
Dan tidak menghasilkan asam dari adonitol sukrosa, salisin dan laktosa.
- e) Tes Indol negatif
- f) Tes *Methyl Red* positif
- g) Tes *Voges-Proskauer* negatif
- h) Sitrat positif
- i) *Lysine decarboxylase* positif
- j) Urease negatif
- k) *Ornithin decarboxylase* positif
- l) Memproduksi H₂S dari thiosulfat
- m) Tidak dapat tumbuh dengan KCN
- n) *Phenylalanin* dan *tryptophan* negatif

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

B. BAHAN

1. Sampel

Sampel diambil dari makanan dan minuman berupa gado-gado, karedok, rujak, minuman dan jamu yang dijual oleh pedagang kaki lima dan berlokasi di sekitar Jalan Margonda Raya, Kelurahan Pondok Cina, Kecamatan Beji, Depok. Pemilihan sampel berdasarkan pada adanya kemungkinan kontaminasi *Salmonella* yang dinilai dari tingkat kebersihan makanan dan minuman, kurangnya air bersih yang mengalir untuk membersihkan bahan, alat pengolahan serta tempat penyajian makanan dan minuman, serta penggunaan bahan mentah dalam makanan dan minuman. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 5.

2. Medium Metode Kultur Standar dan Cara Pembuatan Medium

a. Medium Metode Kultur Standar

Nutrient Agar [Difco]; *Buffered Peptone Water*, *Selenite Cystein Broth* [Difco]; *Agar Salmonella Shigella* [Scharland, Difco]; *Urea Agar* [Laboratorium Mikrobiologi FK UI]; *Triple Sugar Iron* [Difco]; Gula-gula Glukosa Monohidrat [Merck]; Sukrosa [Merck]; Laktosa Monohidrat [Merck].

b. Cara Pembuatan Medium

1) *Nutrient Agar*

Sebanyak 23 g bubuk agar disuspensikan dalam akuades hingga mencapai volume 1L. Kemudian suspensi dipanaskan dengan penggoyangan beberapa kali dan didihkan selama 1 menit hingga bubuk terdisolusi sempurna. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Selanjutnya secara aseptis kaldu dibagikan ke dalam tabung dalam keadaan cair. Kemudian didinginkan dalam posisi miring sehingga membentuk agar miring (37)

2) *Buffered Peptone Water*

Untuk membuat 1 liter BPW, ditimbang Peptone sebanyak 10,0 g, Natrium klorida (NaCl) 5,0 g, Dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) 4,0 g, dan

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 1,5 g. Seluruh bahan dilarutkan dalam akuades hingga mencapai volume 1L. Jika diperlukan dapat digunakan pemanasan hingga seluruh bahan dapat terlarut sempurna. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit (37)

3) Kaldu *Selenite Cystein*

Sebanyak 15 g bubuk kaldu *Selenite cystein* disuspensikan ke dalam 1 L akuades steril dan dipanaskan perlahan dengan temperatur tidak lebih dari $60\text{-}70^\circ\text{C}$ hingga bubuk terdisolusi dengan sempurna. Pemanasan yang lebih tinggi atau autoklaf harus dihindari karena dapat mengganggu pengayaan. Kemudian, secara aseptis kaldu dibagi ke dalam labu Erlenmeyer. Jika diperlukan penyimpanan jangka panjang, sterilisasi filtrasi sebelum pembagian harus dilaksanakan. Kemudian labu harus disegel secara sempurna untuk menghindari kehilangan cairan yang menyebabkan perubahan dalam konsentrasi (37).

4) Agar *Salmonella Shigella*

Sebanyak 60 g bubuk agar *Salmonella Shigella* disuspensikan dalam 1 L akuades dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian dipanaskan secara perlahan hingga mendidih dengan beberapa kali pengocokan. Pemanasan dilanjutkan hingga mendidih hingga bubuk terdisolusi sempurna dengan pengocokan terus menerus. Pemanasan medium seperti autoklaf tidak

diperlukan. Agar segera didinginkan dan dituangkan ke dalam cawan petri dalam keadaan cair, kemudian didinginkan hingga medium memadat (37).

5) Agar *Triple Sugar Iron*

Sebanyak 65 g bubuk medium TSI disuspensikan dalam 1 L akuades dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian dipanaskan hingga bubuk terdisolusi sempurna dan dibagikan ke dalam tabung-tabung dengan jumlah 3-4 ml. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 115°C selama 15 menit. Selanjutnya agar didinginkan dalam posisi miring sehingga membentuk agar miring dengan dasar sedalam 3 cm dan daerah miring setinggi 3 cm dari atas (37)

6) Gula-Gula lengkap

Sebanyak 1% gula (Glukosa, Sukrosa, Laktosa) dilarutkan dalam 1 L air Pepton yang mengandung 10,0 g Pepton dan 5,0 g NaCl. Kemudian dibagikan dalam tabung reaksi dan tabung durham dimasukkan ke dalam tabung. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada 115°C selama 15 menit.

7) Medium urea

Untuk membuat 100 ml Agar urea, ditimbang sebanyak 3,0 g Peptone, 0,2 g Natrium klorida, 0,3 agar dan dilarutkan dalam akuades hingga volume 100

mL. Seluruh bahan dilarutkan dan disterilkan dalam autoklaf pada 120°C selama 20 menit. Setelah steril ditambahkan larutan urea 40% yang telah disterilkan sebanyak 10 mL untuk setiap 90 ml media perbenihan. Kemudian ditambahkan dengan 0,2 mL larutan *Phenol red* 0,2% dalam alkohol.

3. Bahan Kimia

Aquadest [Brataco]; Akuabides [Iwadi]; akuabides bebas DNase dan RNase (ddH₂O); Tris base [Merck]; *Etylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) [Sigma]; proteinase-K [Usb]; kloroform [Mallinckrodt]; Isoamil Alkohol [Sigma], sodium dodesil sulfat (SDS) [Sigma], Triton X-100 [Merck]; Natrium Klorida [Oxoid]; Lisozim [Sigma]; PCR Master Mix [Fermentas]; Primer *invA* (Liu dan Ou, 1996) yaitu *invA1* (*forward*): ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT [AIT Biotech] dan *invA2* (*reverse*): AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT [AIT Biotech]; Agarose ultrapure [Invitrogen]; Dapar Tris Borat EDTA (TBE) 0,5x steril; *Loading Buffer*, etidium bromida [Sentra BD]; 1 kb plus DNA *ladder* [Invitrogen].

C. ALAT

Peralatan yang digunakan adalah Inkubator Shaker dengan pengatur suhu [Orbital]; mikrosentrifuse berpendingin [Sorvall Fresco]; dri-bath [Barnstead Thermolyne]; PCR thermal cyler [MJ Mini Biorad]; Mikrosentrifuse Minispin [Eppendorf]; elektroforesis gel mini [mupid-ex

Advance]; UV transluminator [BDA Biometra TI 1]; inkubator; autoclaf [Hirayama, Japan]; Laminar Air Flow Cabinet [Esco]; pHmeter [Eutech]; timbangan analitik [Scout dan Acculab]; lemari pendingin [Toshiba]; freezer -20°C [GEA]; oven [Memmert dan WTB Binder]; vortex mixer [Health]; penangas air [Lab-line]; Pemanas dengan magnetig stirrer [Torrey Pines Scientific]; kamera digital [Canon PowerShot A450]; dan alat-alat yang biasa digunakan pada laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

D. CARA KERJA

1. Peremajaan Bakteri *Salmonella typhi*

Pertama kali kultur stok *Salmonella typhi* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia dikultur dengan menggunakan agar miring *Nutrient Agar*. Dengan menggunakan ose, isolate bakteri digoreskan pada medium agar nutrient secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

2. Uji Pendahuluan

- a Pengujian Primer *invA* untuk Amplifikasi Gen *invA* Spesifik *Salmonella* dengan Ekstraksi dan Isolasi DNA *Salmonella* Metode Modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan *Cethyltrimethylammonium bromide/* CTAB (38)

Sel bakteri dikultur dalam media *Nutrient Broth* pada 37°C selama 24 jam. Kemudian inokulum bakteri dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 mL steril dan disentrifus dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C, selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian supernatan dibuang dan pencucian dilakukan berkali-kali hingga seluruh kultur. Pelet sel yang didapat disuspensikan kembali ke dalam 557 µL dapar STET. Setelah itu sebanyak 10 µL larutan Lisozim 10 mg/mL, 30 µl SDS 10 % dan 4 µL proteinase-K ditambahkan dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan *microtube* selama beberapa kali. Kemudian suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Selanjutnya sebanyak 65 µL NaCl 4 M dan 80 µL CTAB ditambahkan ke dalam suspensi, di vortex dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30-60 menit.

Langkah selanjutnya adalah melakukan ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol (24:1, v/v) sebanyak 650 µL (624 µL kloroform dan 26 µL isoamilalkohol). Campuran kemudian divortex dan disentrifuse dengan mikrosentrifuse pada suhu 20°C, selama 20 menit, dengan kecepatan 10.000xg. Supernatan yang didapat diekstraksi kembali dengan Kloroform dan Isoamilalkohol, kemudian divortex dan disentrifuse dengan mikrosentrifuse pada suhu 20°C, selama 20 menit, dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru dan steril, dilanjutkan dengan penambahan isopropanol dingin sebanyak 400 µL. Larutan dibolak-balik secara perlahan sampai terlihat adanya benang-benang putih halus (benang DNA). Larutan yang

mengandung DNA tersebut kemudian disentrifus pada suhu 20°C, selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian pelet DNA ditambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 ml dan *microtube* dibolak-balik beberapa kali secara perlahan-lahan. Larutan tersebut kemudian disentrifus pada suhu 20°C selama 2 menit dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan di udara (kira-kira 2 jam). Setelah kering, pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 40 µL air MilliQ (ddH₂O) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah didapatkan ekstrak DNA menggunakan metode CTAB, maka dilakukan amplifikasi DNA *Salmonella* dengan metode PCR. DNA hasil ekstraksi dapat disimpan di lemari pendingin dengan suhu -20°C.

b Uji Batas Deteksi Metode *Polymerase Chain Reaction/ PCR* dengan Ekstraksi DNA *Salmonella* Menggunakan Metode *Boiling*

Sel bakteri *Salmonella* pada *Nutrient Agar* (NA) miring dikultur pada *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sebanyak 9 buah tabung berisi 9 ml NB steril diberi label 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹. Dengan menggunakan teknik aseptis, sebanyak 1 mL inokulum *Salmonella* dalam NB dimasukkan dalam 9 mL NB dan divortex sehingga terbentuk pengenceran 10⁻¹. Pengenceran dilakukan beberapa kali hingga terbentuk pengenceran 10⁻⁹ (39)

Sebanyak 1 mL suspensi kuman dari kultur NB dan suspensi kuman dengan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-2} dimasukkan dalam *microtube* 1,5 ml, kemudian dilakukan metode *boiling* untuk menyiapkan DNA cetakan bakteri untuk uji batas deteksi PCR. Suspensi sel disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian supernatan dibuang dengan hati-hati. Pelet disuspensi kembali dengan 300 μ l ddH₂O menggunakan vortex. Kemudian *microtube* diinkubasi pada 100°C selama 15 menit dan sesudahnya segera dimasukkan dalam es. Tabung disentrifugasi pada 14.000xg selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru. Supernatan sebanyak 10 μ L digunakan sebagai DNA cetakan pada PCR (13).

Kemudian dilakukan penentuan angka kuman untuk mengetahui konsentrasi bakteri yang digunakan untuk uji batas deteksi. Sebanyak 1 ml suspensi kuman dengan pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-9} dipindahkan ke dalam cawan petri, kemudian dituangkan NA cair (suhu 48°C-50°C). Kemudian agar dan inokulum kuman disuspensiakan dengan menggoyang cawan petri membentuk angka delapan. Setelah agar membeku, cawan dibalik dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Percobaan ini dilakukan sebanyak dua kali (duplo). Setelah diinkubasi selama 24 jam, cawan petri yang terdiri dari 30-300 koloni diseleksi dan dihitung koloni yang terbentuk. Angka kuman (CFU) tiap ml didapatkan dengan membagi jumlah koloni dengan faktor pengenceran yang dikali dengan jumlah suspensi yang ditambahkan pada agar (39).

$$\text{Angka kuman (CFU)} = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{Pengenceran} \times \text{jumlah inokulum (mL)}}$$

3. Pengumpulan dan Penanganan Sampel

Sampel makanan dan minuman dibeli dari pedagang kaki lima dengan menggunakan wadah/ bungkus tertutup dan segera dibawa ke laboratorium dengan kondisi semirip mungkin dengan kondisi awal sampel. Sampel dilabel dan dicatat waktu serta tanggal pengambilan sampel (40). Jika memungkinkan, pengujian sampel dilakukan segera setelah pengambilan sampel. Penyimpanan sampel yang cepat membusuk dan dalam keadaan tidak beku pada suhu 0-4°C tidak lebih dari 36 jam. Sebelum menangani sampel, daerah kerja harus dibersihkan dengan desinfektan. Sampel dihomogenisasi terlebih dahulu sebelum pengujian, untuk sampel yang berupa cairan dikocok dan sampel padat dihomogenisasi dengan menggunakan sendok steril (40).

4. Prapengayaan Sampel

Sebanyak 25 gram sampel makanan dihomogenisasi dalam 225 ml BPW dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam untuk menumbuhkan bakteri. Kemudian kaldu prapengayaan dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama dilakukan metode penyiapan DNA cetakan bakteri dari sampel makanan, amplifikasi dengan PCR dan identifikasi dengan gel agarosa. Bagian kedua

digunakan untuk mengkonfirmasi ketidakberadaan *Salmonella* menggunakan metode kultur standar (13)

5. Kontrol Negatif Internal

Sampel makanan yang bebas *Salmonella* dihomogenisasi dalam 225 mL *Buffer Peptone Water* (BPW) dalam labu Erlenmeyer steril dan diinkubasi dalam *orbital shaker* pada 37°C selama 24 jam dengan 75 rpm. Kaldu prapengayaan dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama dilakukan metode penyiapan DNA cetakan bakteri dari sampel makanan, amplifikasi dengan PCR dan identifikasi dengan gel agarosa. Bagian kedua digunakan untuk mengkonfirmasi ketidakberadaan *Salmonella* menggunakan metode kultur standar (13)

6. Kontrol Positif Internal

Sampel makanan yang bebas *Salmonella* dihomogenisasi dalam 225 ml *Buffer Peptone Water* (BPW) dalam labu Erlenmeyer steril kemudian diinokulasi dengan kuman *Salmonella* dan diinkubasi dalam *orbital shaker* pada 37°C selama 24 jam dengan 75 rpm. Bagian pertama dilakukan metode penyiapan DNA cetakan bakteri dari sampel makanan, amplifikasi dengan PCR dan identifikasi dengan gel agarosa. Bagian kedua digunakan untuk mengkonfirmasi ketidakberadaan *Salmonella* menggunakan metode kultur standar (13)

7. Penyiapan DNA cetakan *Salmonella* dari sampel makanan untuk *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sebanyak 1 mL sampel prapengayaan diambil dan dimasukkan dalam *microtube* dengan kapasitas 1,5 mL. Suspensi sel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000xg. Kemudian supernatan dibuang dengan hati-hati. Pelet disuspensi kembali dengan 300 μ L ddH₂O menggunakan vortex. Kemudian suspensi disentrifugasi pada 14.000xg selama 5 menit, dan supernatan dibuang dengan hati-hati. Jika masih terdapat sisa medium, pelet dicuci kembali dengan ddH₂O. Pelet disuspensi kembali dengan 300 μ L ddH₂O menggunakan vortex kemudian diinkubasi pada 100°C selama 15 menit dan sesudahnya segera dimasukkan dalam es. Suspensi disentrifugasi pada 14.000xg selama 4 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada 100°C dan segera dimasukkan dalam es. Supernatan sebanyak 10 μ L digunakan sebagai DNA cetakan pada PCR (13)

8. Amplifikasi DNA *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sebanyak 10 μ L supernatan (template DNA) ditambahkan dengan PCR *master mix* yang terdiri dari *buffer* PCR, 4 mM MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP masing-masing sebanyak 0,4 mM, 0,05 U/ μ l *Taq polymerase* dan 1 μ M primer dan ditambahkan ddH₂O hingga mencapai volume 25 μ L.

Selanjutnya DNA target diamplifikasi dengan PCR. Pada masing-masing reaksi amplifikasi selalu disertai dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi tahap denaturasi pada 94°C selama 30 detik, tahap pelekatan 56°C selama 30 detik dan tahap pemanjangan pada 72°C selama 2 menit. Pada siklus pertama, mikstur PCR diinkubasi pada suhu 94°C selama 1 menit. Setelah siklus yang terakhir, mikstur PCR diinkubasi pada 72°C selama 10 menit (3,11,14)

9. Analisis Amplikon Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Agarosa dibuat dengan konsentrasi 2% dengan cara melarutkan 1,6 g agarosa dalam 80 mL dapar Tris Boric EDTA (TBE) 0,5x steril, kemudian dididihkan. Setelah sedikit lebih dingin, pada larutan agar ditambahkan 2 µl etidium bromide 100 µl/ml dan dihomogenkan. Larutan kemudian dituang kedalam cetakan gel, sisir dipasang, dan larutan didiamkan hingga membeku. Wadah diberi dapar 0,5x TBE secukupnya (hingga menggenangi agarosa) (28).

Loading Buffer dipipet sebanyak 3 µl dan diletakkan di atas parafilm. Ke dalam *loading buffer* tersebut ditambahkan amplikon hasil proses PCR sebanyak 3 µl dan diresuspensikan dengan pemipetan. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati menggunakan mikropipet (gambar7). Pelindung wadah ditutup dan elektroforesis

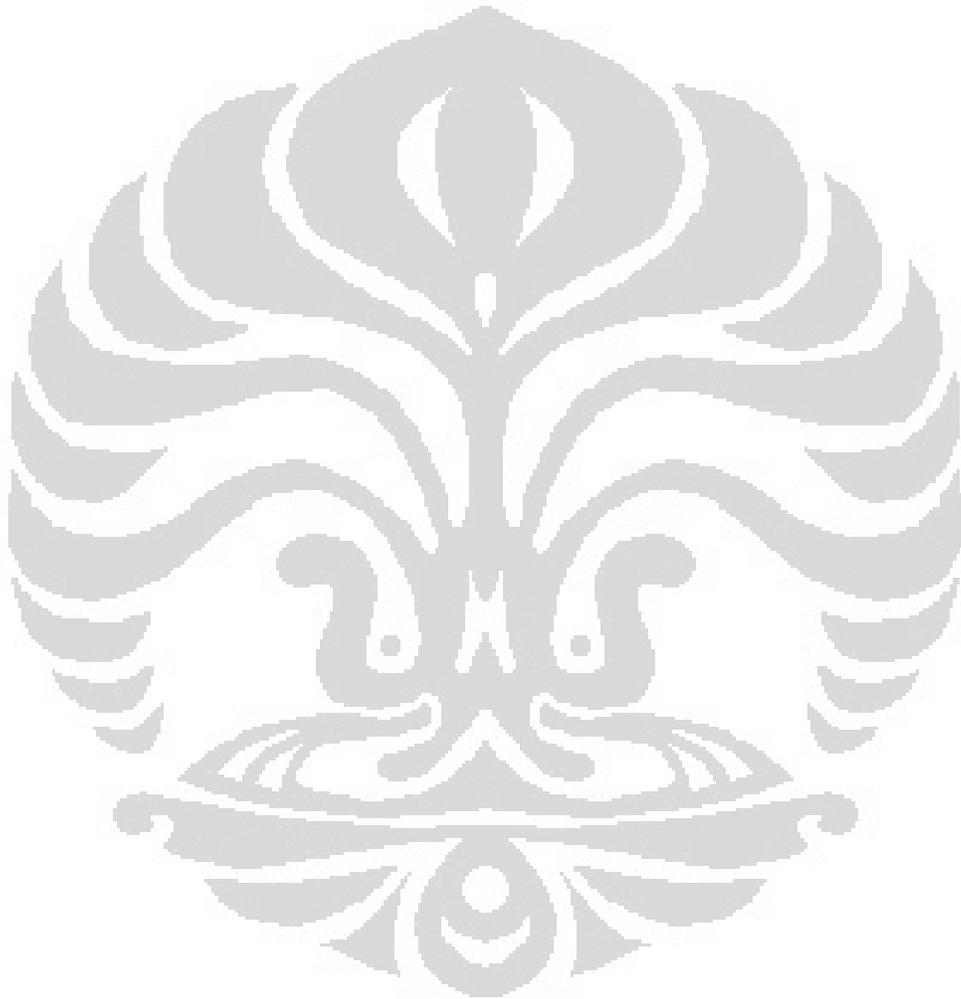
dinyalakan. Tegangan diatur sebesar 50 volt. Kemudian alat dijalankan sampai warna Xylene cyanol mencapai 1 cm dari bagian tepi bawah gel (28).

Selanjutnya pita-pita DNA diamati melalui UV-transluminator pada panjang gelombang 590 nm dan hasilnya difoto. Foto gel dilakukan dengan kamera digital di dalam cungkup (*hood*) yang dihubungkan dengan komputer, sehingga dapat diedit dan dicetak (28)

10. Metode Kultural Standar

Setelah diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, kaldu prapengayaan (BPW) sebanyak 1 mL diinokulasi dalam 10 mL kaldu *Selenite cystein* (SC). Kultur kaldu kemudian diinkubasi pada 37±1°C selama 24±3 jam. Setelah diinkubasi, masing-masing kultur kaldu digoreskan pada medium selektif, yaitu agar *Salmonella Shigella* dan diinkubasi pada 37°C selama 24±3 jam (13). Kemudian dilakukan pengamatan pada subkultur. Pada media *Salmonella Shigella* akan tumbuh koloni tidak berwarna yang menunjukkan adanya *Salmonella*. Jika terdapat isolat, dilakukan pengujian biokimia dengan menggunakan agar miring *Triple Sugar Iron* (TSI), uji gula-gula dan agar urea (12,13). Evaluasi pada *Triple Sugar Iron* yang menunjukkan adanya *Salmonella* adalah produksi asam dari fermentasi glukosa pada bagian dasar yang ditunjukkan dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning, sedangkan pada bagian miring tidak terjadi perubahan warna pada medium karena tidak memfermentasi laktosa. Pada beberapa jenis *Salmonella* akan

membentuk warna hitam pada dasar karena produksi H_2S yang bereaksi dengan garam besi sehingga membentuk besi sulfida berwarna hitam (37).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

Pada uji pendahuluan dilakukan PCR dengan primer *invA* pada DNA *Salmonella* yang diisolasi menggunakan metode CTAB. Hasil pengamatan amplikon dari DNA *Salmonella* pada elektroforesis gel agarosa menunjukkan adanya pita DNA pada gel agarosa (hasil ditunjukkan pada gambar 12).

Pada pengujian batas deteksi PCR, dilakukan PCR pada cetakan DNA *Salmonella* yang diekstraksi dengan menggunakan metode *boiling* dengan konsentrasi bakteri $2,85 \times 10^7$, $2,85 \times 10^6$, dan $2,85 \times 10^5$ CFU/mL. Hasil pengamatan pada elektroforesis gel agarosa menunjukkan adanya pita DNA pada kultur *Salmonella* dengan konsentrasi $2,85 \times 10^7$ CFU/mL dan $2,85 \times 10^6$ CFU/ml (hasil ditunjukkan pada gambar 12).

Dari 21 sampel makanan dan minuman yang diuji dalam penelitian ini, sebanyak 3 sampel yaitu sampel SKMSPC, SKMDG dan SBGS terdeteksi bakteri *Salmonella* dengan menggunakan metode PCR dengan adanya amplikon berukuran kira-kira 244 pb namun tidak terdeteksi pada metode kultur standar (hasil ditunjukkan dengan gambar 13,14 dan tabel 6). Sebanyak 1 sampel yaitu sampel SPC terdeteksi dengan metode kultur standar dan kombinasi metode kultur standar yang dilanjutkan PCR (hasil ditunjukkan pada tabel 6, gambar 13,14,16,17,19-23). Sebanyak 1 sampel yaitu sampel SKMDGU tidak terdeteksi dengan metode kultur standar dan

tidak terdeteksi dengan metode PCR serta menghasilkan amplicon non spesifik (hasil ditunjukkan pada gambar 13,14 dan tabel 6).

B. PEMBAHASAN

Salmonella merupakan bakteri patogen utama yang mengkontaminasi makanan, sehingga identifikasi bakteri ini merupakan aspek yang penting dalam bidang kesehatan (3,41). Metode kultur standar merupakan metode yang sering digunakan untuk identifikasi *Salmonella*. Identifikasi *Salmonella* dalam makanan menggunakan metode kultur standar memerlukan waktu 4 hingga 5 hari (12,42). Salah satu metode cepat dan sensitif yang telah dikembangkan untuk mengidentifikasi *Salmonella* adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dapat mengamplifikasi gen spesifik dari *Salmonella* sehingga dapat dideteksi dengan gel elektroforesis (3,41,42). Dalam penelitian ini, dilakukan deteksi *Salmonella* dalam makanan dan minuman menggunakan metode PCR dan dikonfirmasi dengan metode kultur standar.

Metode PCR mencakup teknik hibridisasi dengan pelacak asam nukleat spesifik dan teknik amplifikasi fragmen DNA (44). Material genetik suatu organisme membawa informasi genetik yang menghasilkan senyawa tertentu. Secara teori, urutan nukleotida yang menghasilkan senyawa biologis tertentu merupakan suatu penanda spesifik yang dapat digunakan sebagai penentu untuk diagnosa (44). Dalam patogenesis *Salmonella*, invasi dalam sel

epithelial mukosa intestinal untuk mencapai aliran darah merupakan langkah awal yang penting (24). Beberapa gen yang berhubungan dengan invasi telah diidentifikasi menggunakan pendekatan genetika molekular. Penelitian yang dilakukan Galan, et al pada tahun 1992 mengidentifikasi adanya locus gen *inv* yang memberikan sifat invasi pada *Salmonella* sehingga dapat memasuki sel epithelial (25). Salah satu gen pada locus *inv* adalah *invA* yang ditemukan dan berfungsi pada sebagian strain *Salmonella* yang virulen (10).

Sistem amplifikasi target merupakan metode replikasi enzimatis molekuler target secara *in vitro* sehingga mencapai jumlah yang dapat dideteksi dengan gel agarosa (45). Hal yang diperlukan untuk PCR adalah primer oligonukleotida sintetik yang mengikat daerah DNA target, DNA cetakan sampel yang bekerja sebagai cetakan pertama, *polymerase* DNA yang stabil pada suhu tinggi, dan deoksiribonukleotida (40). Oligonukleotida merupakan sekuen yang dideterminasi oleh sekuen target dan disintesis sebagai komplemen pada tempat pelekatan dalam untai ganda sekuen DNA target (45). Susunan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR (44). Spesifitas metode PCR untuk mendeteksi bakteri bergantung pada ketepatan primer yang digunakan. Untuk mendapatkan spesifitas yang baik diperlukan sekuen primer yang spesifik pada sekuen target (14). Beberapa oligonukleotida primer untuk PCR telah disintesis berdasarkan sekuen target gen *invA* yang spesifik untuk genus *Salmonella* (11). Dalam penelitian ini, digunakan primer *invA* yang disusun oleh Chiu dan Ou pada tahun 1996. Beberapa percobaan yang telah dilakukan untuk menguji spesifitas primer

tersebut menunjukkan bahwa pimer *InvA* spesifik untuk *Salmonella* (3,9,11,14). Pada uji pendahuluan dalam penelitian ini, dilakukan pengujian primer *InvA* untuk mengamplifikasi gen *InvA* spesifik *Salmonella* dengan DNA *Salmonella* yang diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan CTAB.

Sebagai langkah awal, dilakukan peremajaan bakteri *Salmonella* pada agar miring *Nutrient Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sebagian besar bakteri heterotrof, termasuk *Salmonella*, secara rutin diremajakan pada media kompleks, yang dilengkapi nutrisi seperti ekstrak dari *yeast*, daging atau tanaman, atau proteinnya. Media kompleks dalam bentuk cair biasa disebut *Nutrient Broth*, jika ditambahkan agar disebut dengan *Nutrient Agar*. Pada media kompleks, sumber energi seperti karbon, nitrogen dan sulfur diperlukan untuk pertumbuhan bakteri yang disediakan oleh protein. Protein merupakan makromolekul yang relatif sukar larut dimana hanya sedikit mikroorganisme yang dapat menggunakannya secara langsung. Namun, pemotongan parsial oleh asam maupun enzim dapat menguraikan protein menjadi rantai asam amino yang lebih kecil, yang disebut pepton, sehingga dapat dicerna oleh bakteri. Vitamin dan beberapa faktor pertumbuhan organik lainnya disediakan oleh ekstrak daging atau ekstrak *yeast*. Vitamin dan mineral mudah larut dari daging atau *yeast* terlarut pada air pengestrak, yang kemudian mengalami evaporasi sehingga terkonsentrasi (46).

Salmonella merupakan organisme patogen yang harus beradaptasi untuk hidup dalam tubuh inangnya, sehingga memiliki temperatur optimum mendekati inangnya. Temperatur optimum untuk bakteri patogen berkisar 37°C, sehingga inkubator untuk kultur klinik biasanya diatur pada temperatur tersebut (46). Waktu inkubasi yang berlangsung selama 18-24 jam memberikan waktu yang cukup bagi bakteri untuk membentuk koloni dalam jumlah yang cukup untuk analisa makroskopis. Waktu tersebut juga memberikan kesempatan bagi bakteri untuk mencapai fase akhir pertumbuhan atau fase stasionernya. Pada fase ini, mayoritas bakteri telah dewasa dan mampu menunjukkan sifat fenotip dan genetik yang sempurna (46).

Setelah proses peremajaan kultur, dilakukan proses ekstraksi dan isolasi DNA. Kultur yang akan diekstraksi ditanam terlebih dahulu dalam medium cair *Nutrient Broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 27°C selama 18-24 jam. Sel bakteri yang akan diekstraksi dikumpulkan terlebih dahulu dengan mensentrifuse kultur yang ditumbuhkan pada medium cair *Nutrient Broth*. Teknik pemecahan sel dapat dibagi dalam metode fisik, sel dipecah dengan kekuatan mekanik, dan metode kimiawi, sel diperlakukan dengan pemaparan senyawa kimiawi yang mempengaruhi dinding sel (44). Metode kimiawi lebih banyak digunakan untuk preparasi DNA. Metode ekstraksi DNA yang digunakan dalam uji pendahuluan ini adalah modifikasi Murray dan Thompson [1980] dengan menggunakan CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) (38). Metode ini dipilih karena metodenya cukup mudah dan hasil

ekstraksi DNA yang dihasilkan dinilai cukup bersih. Lisis bakteri diawali dengan resuspensi pelet bakteri pada dapar STET yang mengandung sukrosa, tris base, EDTA dan Triton X-100. Dapar STET harus memiliki pH basa lemah (pH 8,00 atau lebih) yang berada di atas kondisi optimum DNase sehingga dapat menginaktivasi DNase. EDTA berperan sebagai khelat Mg^{2+} yang dibutuhkan oleh DNase dan memindahkan Mg^{2+} dari lapisan lipopolisakarida sehingga terjadi kerusakan pada membran luar bakteri gram negatif (35). Setelah gangguan pada membran dilakukan dengan penambahan STET, ditambahkan lisozim yang berguna untuk memotong senyawa polimer dinding sel. Cara ini terkadang cukup untuk memecahkan sel, tetapi biasanya ditambahkan detergen, seperti natrium dedosil sulfat (SDS). Detergen ini membantu proses lisis pada dinding sel dengan menghilangkan lipid pada dinding sel (44). Enzim proteolitik seperti proteinase K sering ditambahkan untuk mendeturasi protein. Proteinase K tidak terdenaturasi dengan adanya SDS, namun bekerja lebih efektif dengan adanya SDS (35,44).

Langkah selanjutnya adalah menghilangkan debris dinding sel, protein terdenaturasi, dan kompleks polisakarida namun menahan asam nukleat pada larutan dengan menggunakan 5% CTAB. CTAB dapat membentuk kompleks tidak larut dengan asam nukleat pada konsentrasi NaCl di bawah 0,5M (47). Untuk memisahkan DNA dari debris sel dilakukan ekstraksi dengan menggunakan kloroform dan isoamilalkohol (24:1 v/v) sehingga terbentuk 2 lapisan larutan yang dibatasi lapisan putih pada antarpermukaan

larutan setelah disentrifugasi. Supernatan yang mengandung DNA kemudian dipipet dan dipindahkan secara seksama dengan mikropipet dalam mikrotube yang baru dan steril. Untuk mengoptimalkan proses ekstraksi ini maka dilakukan ekstraksi ulang dengan kloroform dan isoamilalkohol (47).

Selanjutnya ditambahkan isopropanol dingin dan tabung dibalik-balik secara perlahan sehingga DNA terlihat seperti benang-benang putih transparan yang dapat diendapkan dengan sentrifugasi. Selanjutnya DNA dicuci dengan menggunakan etanol 70% untuk menghilangkan sisa CTAB dan disentrifugasi kembali. Supernatan dibuang secara perlahan dan pelet DNA dikeringkan dari sisa etanol. Pelet DNA kemudian dilarutkan dalam air *MilliQ* (akuabides steril bebas RNase dan DNase (47).

Selanjutnya dilakukan PCR pada DNA cetakan yang diisolasi menggunakan metode CTAB sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui spesifitas primer *invA1*. Untuk memperkirakan banyaknya cetakan DNA yang digunakan dalam PCR, dilakukan pengamatan hasil ekstraksi DNA dengan elektroforesis gel agarose 1,5 %.

Langkah awal dalam proses PCR adalah preparasi alat-alat dan bahan-bahan PCR. Pengerjaan PCR sebaiknya dilakukan di tempat aseptis dan terisolasi dari sumber organisme lain yang menjadi sumber kontaminasi. Seluruh alat dan bahan baik yang langsung digunakan dalam proses PCR maupun peralatan lain yang secara tidak langsung berhubungan dengan PCR, seperti jas lab peneliti dan kain lap harus digunakan pada satu laboratorium dan tidak digunakan untuk tujuan lain. Jika memungkinkan,

digunakan peralatan sekali pakai (*disposable*) seperti tip pipet dan sarung tangan untuk mengurangi kontaminasi dari pengujian sebelumnya. Preparasi reagen-reagen PCR dimulai dengan pencairan reagen (*defrosting*) dan dilanjutkan dengan homogenisasi dan sentrifugasi dengan mikrosentrifus minispin untuk menghindari kontaminasi akibat tetesan reagen di mulut wadah. Kemudian reagen-reagen tersebut diletakkan di atas es sebelum dilakukan pencampuran. Proses pencairan (*defrosting*) tidak boleh dilakukan berkali-kali pada reagen-reagen PCR terutama primer karena akan menyebabkan degradasi fisik primer. Oleh karena itu, reagen-reagen PCR dipindahkan ke tabung kecil untuk penggunaan jangka pendek (*aliquoting*). Selain itu, *aliquoting* dapat mengurangi resiko kontaminasi reagen dalam jumlah banyak (31,48).

Setelah preparasi alat dan bahan, dilanjutkan dengan pencampuran bahan. Untuk campuran PCR yang digunakan, komposisi didapat dari PCR *Master Mix* yang didalamnya sudah terdapat dNTP, enzim DNA *Taq Polymerase*, *buffer* PCR dan $MgCl_2$. PCR *Master Mix* ini dapat mengurangi banyaknya pemipetan dan langkah pencampuran dalam proses PCR sehingga dapat mengurangi kontaminasi dan kesalahan dalam pencampuran reagen yang diperlukan (31). PCR *master mix* dipipet sejumlah 12,5 μ l dikali dengan jumlah sampel yang akan diuji dengan PCR, kemudian ditambahkan primer *invA1* dan *invA2*. Bahan dicampur pada mikrotube dan dilakukan di atas es untuk mencegah reaksi awal reagen-reagen PCR. Penambahan bahan dilakukan di tengah tabung. Pemasukan pipet yang terlalu dalam

dapat menyebabkan terlalu banyak reagen yang menempel di bagian luar pipet yang dapat menyebabkan berkurangnya jumlah reagen yang dimasukkan. Kemudian seluruh bahan dihomogenkan dan disentrifugasi dengan mikrosentrifus minispin dan dibagi dalam beberapa *microtube* yang selanjutnya ditambahkan DNA cetakan (31) (gambar 4,6).

Setelah mengalami siklus termal, produk PCR dianalisa dengan elektroforesis gel agarose. Elektroforesis merupakan teknik pemisahan suatu molekul dalam suatu campuran di bawah pengaruh medan listrik. Molekul terlarut dalam medan listrik bergerak dengan kecepatan yang ditentukan oleh rasio muatan dan massa (44). Gel membentuk matriks yang menahan pergerakan makromolekul sehingga membentuk fragmen yang berbeda-beda. Molekul yang lebih besar akan bergerak melalui matriks gel lebih lambat dibandingkan molekul yang lebih kecil sehingga terjadi pemisahan (35). Agarosa, yang disari dari ganggang laut, merupakan polimer dengan dasar struktur D-galaktosa dan 3,6-anhidro L-galaktosa. Gel agarosa mempunyai daya pemisahan yang lebih rendah dibandingkan gel poliakrilamid, tetapi mempunyai rentang pemisahan lebih besar DNA dari 200 basa sampai 50 kilobasa dapat dipisahkan dengan gel agarosa dengan berbagai konsentrasi agarosa. Gel agarosa dibuat dengan melelehkan agarosa dalam buffer dan kemudian dituangkan pada cetakan dan didiamkan sampai dingin. Setelah mengeras, agarosa membentuk matriks dengan kerapatan yang ditentukan oleh konsentrasi agarosa. Jika medan magnet diberikan di antara kedua ujung gel, DNA yang bermuatan negatif pada pH

netral, bergerak ke anoda. Kecepatan migrasi ini ditentukan oleh ukuran (panjang) DNA, konformasi DNA, konsentrasi agarosa, dan besarnya tegangan yang digunakan. Dengan menggunakan gel dengan konsentrasi yang berbeda-beda, dimungkinkan memisahkan molekul DNA dengan berbagai ukuran (28, 35, 44). Konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2% karena dinilai sesuai untuk memisahkan produk PCR yang diperkirakan berukuran 244 pb (tabel 3).

Selain komponen agarosa, pemilihan dapar elektroforesis memiliki peranan yang sangat penting dalam pembuatan gel, penjagaan pH elektroforesis dan penghantaran arus listrik. pH elektroforesis mempengaruhi muatan molekul yang akan dipisahkan dengan protonasi dan deprotonasi. Karena muatan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi mobilitas elektroforesis, sehingga pH elektroforesis harus dijaga. Dapar elektroforesis yang sering digunakan dalam elektroforesis molekul DNA adalah Tris Asetat EDTA (TAE) dan Tris Borat EDTA (TBE). TAE merupakan dapar elektroforesis yang sering digunakan, namun memiliki kapasitas dapar yang lemah dan tidak stabil setelah elektroforesis dengan periode yang lama. Dapar yang berada pada daerah anoda (elektroda negatif) akan menjadi basa dan yang berada pada daerah katoda (elektroda positif) akan menjadi asam. Dapar TBE memiliki kapasitas yang lebih besar dari TAE namun menurunkan mobilitas elektroforesis pada gel agarosa hingga 10 % (28,35). Dalam penelitian ini, digunakan dapar TBE karena dinilai lebih stabil untuk analisa produk PCR dengan ukuran molekul kecil. Penurunan mobilitas elektroforesis

sebanyak 10% dapat mengurangi kemungkinan lolosnya produk PCR dengan ukuran kecil.

Setelah konsentrasi agarosa dan jenis dapar elektroforesis ditentukan, gel dibuat dengan mensuspensikan agarosa dalam dapar TBE kemudian dididihkan hingga jernih. Agarosa yang tidak mencair akan menghambat pergerakan molekul DNA pada gel. Kemudian agarosa dituang pada cetakan gel yang telah dipasang sisir dengan ukuran sesuai yang diinginkan. Penuangan agarosa dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari terbentuknya gelembung yang dapat menghalangi migrasi molekul DNA. Kemudian agarosa dibiarkan membeku dan sisir ditarik secara hati-hati agar agarosa tidak sobek (35).

Setelah agarosa siap untuk digunakan, langkah selanjutnya adalah pengisian sampel ke dalam sumur gel dan mengelektroforesis DNA pada tegangan dan waktu yang tepat sehingga diperoleh pemisahan molekul yang optimal. Sebelum diisikan, DNA dicampur dulu dengan *loading buffer*. *Loading buffer* mengandung ficol 25% dan *xylene cyanol*. Komponen ficol 25% berguna untuk meningkatkan densitas sehingga memudahkan pemasukan cairan pada sumur dan mencegah difusi produk PCR saat menyentuh dapar elektroforesis. Komponen *xylene cyanol* berfungsi untuk memberikan warna yang dapat memonitor pergerakan DNA (28).

Tegangan yang digunakan dalam elektroforesis dalam penelitian ini sebesar 50 V. Tegangan yang lebih besar dapat menghasilkan panas yang akan meningkatkan difusi pita pada agar dan dapat melelehkan agar.

Distribusi panas yang tidak merata pada gel dapat menyebabkan migrasi elektroforesis yang tidak seragam. Panas lebih teredam pada bagian tepi agarosa daripada bagian tengah, sehingga mobilitas molekul DNA pada bagian tengah agarosa lebih cepat. Akibatnya, molekul-molekul DNA yang memiliki ukuran yang sama akan bergerak dengan bentuk U, atau biasa disebut dengan *smiling* (35) (gambar 7)

Cara yang paling mudah untuk mendeteksi adanya DNA adalah dengan menggunakan etidium bromida, suatu senyawa berfluoresensi yang dapat berinterkalasi dengan basa untai ganda molekul DNA sehingga dapat diamati menggunakan transluminator sinar UV. Karena kemampuan fluoresensi etidium bromida yang berinterkalasi lebih besar daripada dalam keadaan bebas, lokasi DNA dapat teramati dengan fluoresensi jingga (32). Radiasi ultraviolet pada 254 nm diabsorpsi oleh DNA dan ditransmisikan pada etidium bromida. Radiasi pada 302 nm dan 366 nm diserap oleh etidium bromide. Pada kedua energi ini, energinya dipancarkan pada 590 nm pada daerah jingga merah. Senyawa ini sangat karsinogen, sehingga harus diperlakukan dengan sangat hati-hati (44) (gambar 8).

Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR ekstrak DNA *Salmonella* menunjukkan hasil positif dengan adanya pita pada gel agarosa. Oleh karena itu, primer *invA* yang digunakan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mendeteksi *Salmonella*. Parameter-parameter PCR yang digunakan seperti konsentrasi enzim Taq DNA Polymerase, dNTP, MgCl₂ didapatkan dari komposisi PCR *Master Mix* yang sesuai dengan rentang konsentrasi yang

disarankan pada prosedur PCR. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses PCR dapat dilihat pada lampiran 4. Konsentrasi primer yang digunakan disesuaikan dengan konsentrasi primer yang digunakan dalam penelitian Chiu dkk,1996 yang telah menunjukkan bahwa primer *invA* dapat digunakan untuk mendeteksi *Salmonella*.

Setelah diketahui bahwa primer *invA* serta parameter-parameter PCR dapat digunakan untuk mendeteksi *Salmonella*, dilakukan uji batas deteksi PCR dengan penyiapan DNA cetakan menggunakan metode *boiling*. Pada pengujian sensitifitas yang dilakukan oleh Herich dkk.,2004 pada kultur murni *Salmonella* dengan metode ekstraksi *boiling*, menunjukkan bahwa metode PCR dengan primer *invA* dapat mengamplifikasi fragmen spesifik DNA pada suspensi sel yang mengandung 1 CFU/mL (14).

Langkah pertama yang dilakukan dalam uji ini adalah menanam kultur dalam medium cair *Nutrient Broth* (NB), kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya dilakukan penentuan angka kuman pada kultur dan pengenceran konsentrasi suspensi kuman untuk uji batas deteksi PCR. Pada penentuan angka kuman, diperlukan pengenceran kultur dalam medium cair hingga konsentrasi kuman cukup untuk dapat dihitung secara akurat. Oleh karena itu, jumlah koloni akhir yang tumbuh pada media agar dalam cawan petri berada antara 25-250 koloni. Kurang dari 25 koloni dinilai terlalu sedikit untuk merepresentasikan banyaknya kuman dalam sampel. Jika lebih dari 250 koloni, masing-masing koloni terlalu dekat sehingga pertumbuhan koloni akan terganggu dan menyebabkan perhitungan yang

tidak akurat (39,46). Dalam penelitian ini, kultur bakteri dalam NB diencerkan dengan beberapa kali pengenceran hingga mencapai pengenceran 10^9 kali. Pada pengenceran 10^6 hingga 10^9 kali ditumbuhkan pada media *Nutrien Agar* (NA) dalam cawan petri dan diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Pada penentuan angka kuman ini, dilakukan metode *pour plate* dimana setelah suspensi kuman dipipet ke dalam cawan petri, medium NA cair dituangkan ke dalam cawan petri, kemudian setelah medium membeku cawan petri dibalik dan diinkubasi. Sebelum dituangkan, medium agar harus dijaga tetap dalam keadaan cair pada temperatur $\pm 50^\circ\text{C}$ agar bakteri tidak mati pada saat penuangan medium agar (46). Percobaan ini dilakukan sebanyak 2 kali. Setelah 18-24 jam, dilakukan pengamatan pada koloni yang terbentuk pada cawan petri. Pada pengenceran 10^6 kali didapatkan koloni sebanyak 31 dan 26, sehingga dengan perhitungan angka kuman dapat diperkirakan jumlah bakteri dalam kultur NB sebanyak $2,85 \times 10^7$ CFU/mL (tabel 4, lampiran 3). CFU merupakan satuan yang digunakan untuk merefleksikan banyaknya bakteri yang tumbuh dan membentuk koloni baru (46).

Untuk pengujian sensitifitas PCR, sebanyak 1 mL suspensi kuman dari kultur NB dan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-4} (konsentrasi $2,85 \times 10^7$ hingga $2,85 \times 10^3$ CFU) dipindahkan dalam *microtube* 1,5 mL untuk dilakukan penyiapan cetakan DNA dengan menggunakan metode *boiling*. Metode *boiling* merupakan metode ekstraksi DNA yang sederhana, murah dan cepat. Prinsip metode ini adalah pelisisan dinding sel bakteri melalui pemaparan

dengan suhu tinggi di lingkungan yang hipotonis. Bakteri yang dipaparkan dengan air mendidih akan mengalami lisis sel dan denaturasi DNA. Ekstraksi diawali dengan sentrifugasi suspensi sel sehingga didapatkan pelet sel, kemudian pelet sel dicuci dengan akuabides steril bebas DNase dan RNase. Pencucian ditujukan untuk mengurangi pengaruh media yang dapat menjadi inhibitor PCR. Kemudian, pelet bakteri kembali disuspensi dengan akubides steril bebas DNase dan RNase dan dimasukkan dalam *dry bath* yang telah diatur pada suhu 100°C. Penambahan akubides bertujuan untuk menimbulkan lingkungan yang hipotonis diluar lingkungan sel yang hipertonis. Sehingga saat dinding sel mendapat pemaparan suhu tinggi, tekanan osmotik akan bekerja melisis sel dan mengeluarkan seluruh komponen sel termasuk DNA ke lingkungan luar sel. Ketika larutan didinginkan, plasmid DNA akan tetap berada dalam larutan sedangkan DNA genomik mengalami pengendapan. Setelah dingin, DNA dipisahkan dari debris sel dengan menggunakan sentrifugasi pada suhu 4°C. kemudian supernatan dipipet secara hati-hati ke dalam *microtube* yang baru dan dapat digunakan sebagai cetakan DNA untuk PCR. Pengaturan suhu sentrifugasi pada 4°C ditujukan agar tidak terjadi kerusakan pada DNA yang telah berada pada lingkungan ekstrasel pada saat sentrifugasi (33,37).

Setelah diamplifikasi dengan PCR, pengamatan produk PCR dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa metode ekstraksi dan PCR yang digunakan dalam penelitian ini dapat mendeteksi bakteri dengan konsentrasi $2,85 \times 10^7$ dan $2,85 \times 10^6$ CFU/mL yang

ditunjukkan dengan adanya pita spesifik pada gel agarosa pada konsentrasi tersebut. Perbedaan hasil yang signifikan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dapat disebabkan oleh sentrifugasi dan pencucian pelet sel yang kurang sempurna sehingga sisa-sisa media dapat menjadi inhibitor pada PCR. Ketidaksihatian dalam pengambilan supernatan dapat mengakibatkan pelet sel ikut terbawa dalam supernatan. Pencucian pelet sel yang terlalu sering dengan akubides steril bebas DNase dan RNase juga dapat menyebabkan lisisnya sel sebelum proses *boiling*, sehingga jumlah DNA dapat berkurang (49). Berdasarkan hasil uji batas deteksi tersebut, diperlukan langkah prapengayaan sampel dengan media nonselektif untuk meningkatkan jumlah *Salmonella* agar dapat terdeteksi dengan PCR karena kandungan bakteri *Salmonella* dalam makanan sangat kecil.

Setelah dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui spesifitas dan uji batas deteksi PCR, dilakukan deteksi *Salmonella* pada sampel makanan dan minuman dengan metode PCR. Sampel berasal dari makanan dan minuman siap saji yang dibeli dari pedagang kaki lima yang berada di jalan Margonda Raya, Pondok Cina Depok. Makanan dan minuman dengan bahan dasar sayuran dan buah-buahan yang dijual di pedagang kaki lima dinilai mudah terkontaminasi *Salmonella*. Kontaminasi dapat berasal dari proses pencucian, pengolahan, penyajian yang tidak higienis serta penggunaan es maupun air untuk mencuci bahan dan alat yang telah terkontaminasi *Salmonella* (2). Pemilihan sampel berdasarkan pada tingkat kebersihan makanan dan minuman, kurangnya air bersih yang mengalir untuk membersihkan bahan,

alat pengolahan serta tempat penyajian makanan dan minuman, serta penggunaan bahan mentah dalam makanan dan minuman. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 5. Pemilihan lokasi dalam penelitian ini juga berdasarkan pertimbangan lokasi pengambilan sampel yang dekat dengan lingkungan kampus UI Depok dengan konsumen sebagian besar mahasiswa, selain itu juga melaksanakan Tridharma Perguruan Tinggi dalam pengabdian kepada masyarakat.

Sampel makanan dan minuman dibeli dari pedagang kaki lima dengan menggunakan wadah / bungkus tertutup dan segera dibawa ke laboratorium dengan kondisi semirip mungkin dengan kondisi awal sampel, kemudian diberi label dan dicatat waktu serta tanggal pengambilan sampel. Selanjutnya pengujian sampel dilakukan segera setelah sampel diterima. Sampel yang cepat membusuk dan dalam keadaan tidak beku disimpan pada suhu 0° - 4° C tidak boleh lebih dari 36 jam (40). Dalam penanganan sampel digunakan peralatan yang telah disterilkan sehingga tidak mempengaruhi keadaan mikroorganisme dalam sampel, selain itu daerah kerja juga harus dibersihkan dengan desinfektan sebelum penanganan sampel.

Selanjutnya dilakukan langkah prapengayaan sampel dalam media *Buffered Peptone Water* (BPW) (pH $7,0 \pm 0,2$). Sebanyak 25 g atau 25 mL sampel dimasukkan dalam 225 ml BPW yang telah disterilkan, kemudian diinkubasi dalam inkubator berotasi dengan 75 rpm pada 37° C selama 18-24 jam. Penggunaan rotasi pada inkubator dimaksudkan untuk menghomogenkan sampel untuk mengoptimalkan penemuan bakteri pada

seluruh bagian makanan. Dalam proses deteksi dan isolasi *Salmonella* dari makanan dapat terjadi kesulitan karena jumlah bakteri *Salmonella* dalam makanan sangat sedikit dengan tingginya jumlah organisme kompetitor lainnya. Selain itu, bakteri *Salmonella* seringkali dalam keadaan lemah akibat akibat proses pengolahan makanan maupun adanya faktor intrinsik dalam makanan (50). Oleh karena itu diperlukan langkah prapengayaan dengan media nonselektif untuk mengaktifkan kembali bakteri *Salmonella* dan untuk meningkatkan jumlah bakteri sehingga dapat terdeteksi dengan metode PCR. BPW merupakan medium cair yang sering digunakan untuk prapengayaan *Salmonella* dalam berbagai makanan. BPW dapat menjaga PH optimal media pertumbuhan dari perubahan pH akibat pertumbuhan dan metabolisme organisme selama proses pengayaan dan kondisi makanan (50).

Setelah dilakukan langkah prapengayaan sampel, dilakukan langkah deteksi *Salmonella* dengan metode PCR dan dikonfirmasi dengan metode kultur standar. Sebanyak 1 mL hasil prapengayaan dilakukan proses penyiapan cetakan DNA dengan metode *boiling* untuk PCR, dan sebanyak 1 mL lainnya dipindahkan dalam medium selektif *Selenite Systeine* untuk mengkonfirmasi keberadaan *Salmonella* dalam sampel menggunakan metode kultur standar. Pengujian pada kontrol positif dan kontrol negatif *Salmonella* selalu dilakukan pada setiap seri pengujian sampel ditujukan untuk mengetahui reproduksibilitas metode yang digunakan, baik metode ekstraksi, PCR maupun metode kultur standar.

Pada pendeteksian *Salmonella* dari sampel makanan dengan PCR, metode ekstraksi *boiling* yang dilakukan untuk menyiapkan DNA cetakan sama dengan metode ekstraksi *boiling* untuk menyiapkan DNA cetakan *Salmonella* dari kultur murni dengan penambahan langkah *boiling* menjadi 2 kali. Sebanyak 1 mL hasil prapengayaan dipipet ke dalam *microtube* baru ukuran 1,5 mL selanjutnya disentrifugasi untuk mendapatkan pelet sel dan dicuci dengan ddH₂O hingga sisa-sisa medium hilang. Selanjutnya pelet sel diresuspensi dengan ddH₂O dan *diboiling* untuk melisis sel dan melepaskan DNA sel. Pemisahan DNA dari debris sel dilakukan dengan sentrifugasi dan supernatan dipindahkan ke mikrotube steril yang baru. Selanjutnya supernatan kembali *diboiling* selama 10 menit yang dimaksudkan untuk mengoptimalkan proses ekstraksi DNA dari sel dan menjaga agar DNA tidak membentuk *supercoil* sehingga menyulitkan proses amplifikasi. Kemudian supernatan digunakan sebagai cetakan DNA dalam proses PCR dan dianalisa dengan elektroforesis gel agarosa (28).

Pada deteksi *Salmonella* menggunakan metode kultur standar, setelah langkah prapengayaan dilakukan penanaman pada medium selektif. Medium selektif yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Selenite Cystein* (SC) yang direkomendasikan untuk digunakan pada pengayaan *Salmonella* baik dari feses, makanan, maupun bahan lain. Selenit dalam media SC menghambat pertumbuhan bakteri *coliform* dan *enterococci* selama 12 jam pertama dari inkubasi, kemudian efek penghambatan berkurang bertahap, namun *Salmonella*, *Shigella*, *Sonnei*, *Proteus* dan *Pyocyaneus* kurang

dihambat sejak awal inkubasi. Pada proses pembuatan media SC tidak digunakan pemanasan pada suhu tinggi (berkisar 60°-70°C) maupun autoklaf karena dapat mengganggu pengayaan (37). Oleh karena itu, media SC harus dibuat segera sebelum digunakan, dan jika diperlukan penyimpanan jangka panjang, sterilisasi filtrasi harus dilaksanakan. Kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18-24 jam.

Setelah diinkubasi, kultur dipindahkan pada medium selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dengan membuat goresan kultur pada media dalam cawan petri untuk mendapatkan koloni tunggal *Salmonella*. SSA mengandung komposisi *brilian green* dan garam empedu yang dapat menghambat bakteri gram negatif berkembang, selain itu, pertumbuhan bakteri *coliform* juga dihambat dengan tingginya kadar tiosulfat dan sitrat. Ion besi dalam SSA juga dapat menunjukkan adanya hidrogen sulfat yang dihasilkan oleh *Salmonella* dengan adanya thiosulfat yang diindikasikan dengan pigmen hitam akibat terbentuknya senyawa ferisulfat. Laktosa yang terkandung dalam SSA berfungsi sebagai reaktan yang menunjukkan adanya bakteri *coliform* dengan pigmen koloni pink dengan pH indikator *netral red*. Pada media SSA, koloni *Salmonella* berwarna dengan media (*transluent*) dan berbentuk lingkaran halus (*smooth*). Kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam (gambar 15) (37). Pengkulturan pada media SSA dapat dilakukan beberapa kali hingga terbentuk koloni tunggal bakteri yang diduga *Salmonella*.

Kemudian, dilakukan pengujian biokimia koloni bakteri yang diduga *Salmonella* pada media diferensial seperti laktosa, sukrosa, glukosa dan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Pada media Laktosa, Sukrosa, dan Glukosa ditambahkan indikator pH *Brom Cresol Purple* yang dalam keadaan basa/netral berwarna ungu dan berwarna kuning dalam keadaan asam serta ditambahkan tabung durham sebagai indikator terbentuknya gelembung akibat proses fermentasi oleh bakteri. *Salmonella* merupakan bakteri gram negatif yang tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa sehingga tidak menghasilkan asam dan perubahan warna indikator serta tidak menghasilkan gelembung pada tabung durham. Pada media glukosa, terjadi perubahan warna media akibat fermentasi gula oleh bakteri sehingga terbentuk asam, namun tidak terbentuk gelembung gas pada tabung durham yang dapat dibedakan dengan bakteri *Escherichia coli* (gambar 18) (37)

Media TSIA mengandung laktosa, glukosa, sukrosa, ion besi dan thiosulfat serta indikator *phenol red*. Agar dalam tabung reaksi dibuat dalam bentuk miring (*slant agar*) dan dalam (*deep agar*). Bakteri ditanam pada *slant* menggoreskan ose pada permukaan dan pada bagian *deep* dengan posisi tegak menggunakan ose lurus. Fermentasi gula akan menghasilkan asam yang diindikasikan dengan perubahan warna dari jingga merah menjadi kuning, sedangkan kondisi basa diindikasikan dengan perubahan warna jingga menjadi merah tua. Fermentasi glukosa oleh *Salmonella* membentuk asam dan perubahan warna pada bagian dasar saja karena kecilnya jumlah asam yang dihasilkan dan penguapan pada bagian permukaan, sehingga

pada bagian permukaan miring agar berwarna merah tua. *Salmonella* dapat mereduksi thiosulfat menjadi hidrogen sulfida yang akan bereaksi dengan ion besi membentuk pigmen hitam besi (III) sulfida (gambar 18) (37).

Medium urea dapat menunjukkan adanya aktivitas enzim urease yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella*. Medium urea mengandung urea yang jika terurai dengan adanya urease, membentuk basa yang dapat diamati dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah dengan adanya indikator *Phenol Red* (37).

Dari pengujian 21 sampel makanan dan minuman dengan metode PCR, sebanyak 3 sampel minuman yaitu sampel SKMSPC, SKMDG dan SBGS terdeteksi adanya *Salmonella* menggunakan metode PCR dengan adanya pita pada gel agarosa berukuran sekitar 244 pb, namun tidak terdeteksi pada uji biokimia metode kultur standar (hasil ditunjukkan dengan gambar 13,14 dan tabel 6). Sampel ini bersumber dari Es Kelapa Muda yang kemungkinan adanya kontaminasi berasal dari es batu yang diproduksi dari air mentah dan terabaikannya kebersihan dalam penyimpanan es batu (gambar 3). Pada pengujian sampel ini terdapat perbedaan hasil antara metode PCR dengan Metode Kultur Standar, hal ini dapat disebabkan oleh kecilnya jumlah *Salmonella* dalam sampel dan adanya bakteri kompetitor lainnya dengan bentuk koloni menyerupai *Salmonella* sehingga dapat mengkontaminasi pengujian biokimia metode kultur standar dan memberikan hasil yang tidak sesuai (negatif palsu) (42). Pada metode PCR, waktu yang dibutuhkan dari

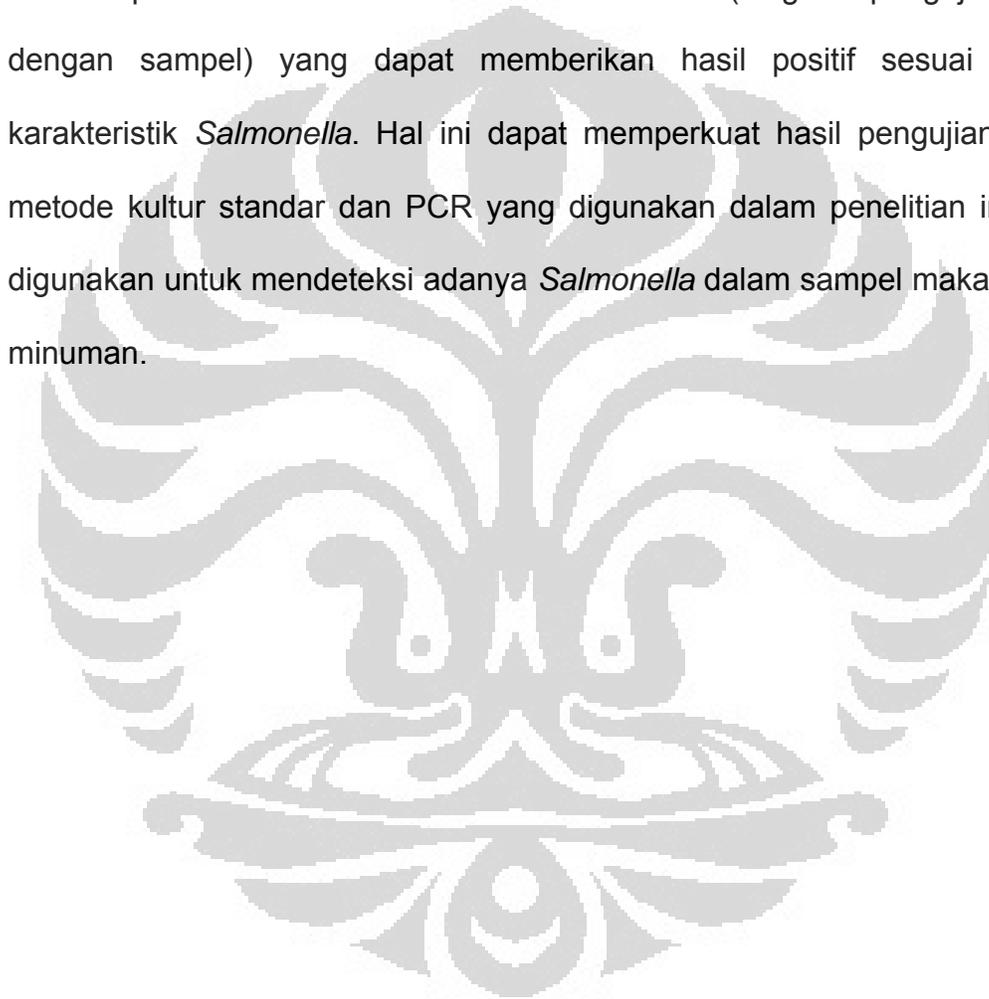
pengambilan sampel hingga mendapat hasil positif sekitar 2 hari, sedangkan pada metode kultur standar, waktu yang diperlukan mencapai 5 hari.

Pada 1 sampel yaitu sampel SKMDGU, ditemukan adanya pita tidak spesifik pada analisis elektroforesis hasil PCR sampel, yang juga tidak terdeteksi *Salmonella* dengan metode kultur standar (gambar 14 no. 21, tabel 6). Hal ini dapat disebabkan karena adanya organisme lain yang memiliki susunan basa DNA yang menyerupai DNA target *Salmonella* sehingga dikenali oleh primer sebagai DNA target *Salmonella* dan memberikan pita tidak spesifik pada analisa amplicon dengan elektroforesis gel agarosa (9).

Pada 1 sampel yaitu sampel SPC, yang bersumber dari Es Kelapa Muda, tidak terdeteksi *Salmonella* dengan metode PCR menggunakan ekstraksi DNA *Salmonella* metode *boiling* yang berasal dari media prapengayaan, namun dapat terdeteksi *Salmonella* dengan metode kultur standar. Setelah dilakukan PCR pada isolat *Salmonella* hasil metode kultur standar, terdapat pita spesifik pada analisa elektroforesis hasil PCR (gambar 14 no.22, tabel 6). Isolat *Salmonella* diambil dari medium TSIA kemudian dikultur dalam medium cair *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan ekstraksi DNA metode *boiling* dari suspensi kuman pada *Nutrient Broth*. Selanjutnya ekstrak DNA diamplifikasi dengan PCR dan amplicon yang dihasilkan dianalisa dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis pada gel agarosa menunjukkan adanya pita dengan ukuran sekitar 244 pb. Penggabungan metode kultur standar dengan PCR dapat meningkatkan jumlah *Salmonella* dengan proses isolasi dan pengayaan sebelum dilakukan

ekstraksi dan amplifikasi DNA *Salmonella*, sehingga *Salmonella* dalam sampel dapat terdeteksi dengan metode PCR (38). Waktu yang diperlukan untuk penggabungan metode kultur standar dan PCR mencapai 6 hari.

Pada setiap seri pengujian sampel, dilakukan pengujian kontrol positif internal pada metode kultur standar dan PCR (langkah pengujian sama dengan sampel) yang dapat memberikan hasil positif sesuai dengan karakteristik *Salmonella*. Hal ini dapat memperkuat hasil pengujian bahwa metode kultur standar dan PCR yang digunakan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya *Salmonella* dalam sampel makanan dan minuman.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

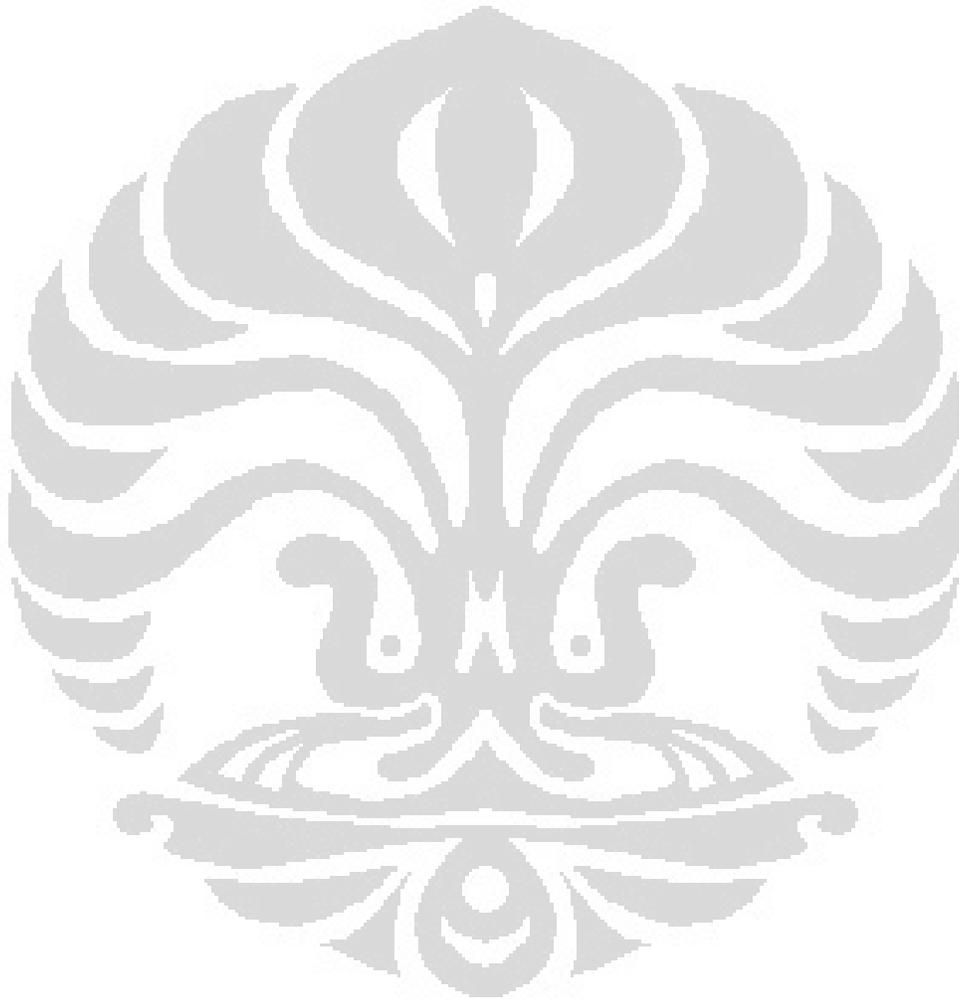
A. KESIMPULAN

1. Metode PCR menggunakan primer *invA* dengan ekstraksi DNA metode *boiling* dan dilanjutkan dengan elektroforesis gel agarosa 2%, dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri *Salmonella* dalam sampel makanan dan minuman dengan adanya ampikon berukuran 244 pb
2. Sebanyak 4 dari 21 sampel yang diuji, terdeteksi *Salmonella* dengan metode PCR, 3 sampel diantaranya tidak terdeteksi dengan metode kultur standar dan 1 sampel lainnya terdeteksi dengan metode kultur standar yang dilanjutkan dengan metode PCR.
3. Untuk meningkatkan jumlah *Salmonella* dalam sampel makanan dan minuman agar dapat terdeteksi dengan metode PCR, dapat dilakukan kombinasi metode kultur standar dan metode PCR, namun dibutuhkan waktu yang lebih lama.

B. SARAN

1. Perlu dikembangkan metode ekstraksi DNA *Salmonella* sehingga dapat meningkatkan sensitifitas metode PCR untuk mendeteksi *Salmonella*.

2. Metode ekstraksi dan amplifikasi DNA *Salmonella* yang cepat dan mudah perlu dikembangkan untuk identifikasi bakteri *Salmonella* pada spesimen klinik.



DAFTAR ACUAN

1. Black JG. 1990. Microbiology Principle and Exploration. Prentice Hall, New Jersey: 756-762
2. Heritage J, Evans EGV, Killington RA. 1999. Microbiology in Action. Cambridge University Press, United Kingdom: 106-109
3. Jenikova G, Pazlarova J, Demnerova K. 2000. Detection of Salmonella in Food Samples by Combination of Separation and PCR Assay. International Microbiology 3: 225-229.
4. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mc Gaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 2000. Synopses Food-Related Illness and Death in United States. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/pdf/mead.pdf>. September. 31 Januari 2008: pk. 20.00
5. Darmowandono W. 2002. Demam Tifoid. Dalam: Soedarmo SS, Garna H, Hadinegoro SR (ed). Buku Ajar Ilmu Kesehatan Anak: Infeksi dan Penyakit Tropis edisi 1. BP FKUI, Jakarta: 367-375
6. Februhartanti J, Iswarawanti DN. 2004. Amankah Makanan Jajanan Anak Sekolah di Indonesia. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?newsid1097726693,98302>, 14 Oktober: 3 hlm. 31 Januari 2008: pk. 19.30
7. Brook TD, Madigan MT. 1991. Biology of Microorganism 6th edition. Prentice Hall, USA: 291-293, 114-119
8. Moganedi KLM, Goyvaerts EMA, Venter SN, Sibara MM. 2007. Optimisation of the PCR-invA primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following pre-cultivation

- step. <http://www.wrc.org.za/downloads/watersa/2007/Apr%2007/1931.pdf>. 2 April: 195-202
9. Ziemer CJ, Steadham SR. 2003. Evaluation of the Specificity of Salmonella PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*. 16 September 2003. 37: 463-469.
10. Galan JE, Ginocchio CC. 1995. Functional Conservation among Members of the Salmonella typhimurium InvA Family of Protein. *American Society for Microbiology* 63 (2): 729-732.
11. Chiu CH, Ou JT. 1996. Rapid identification of Salmonella Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, invA dan spvC, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. *American Society for Microbiology* 34(10): 2619-2622.
12. Health Protection Agency. 2007. Detection of Salmonella Species. F13 Issued by Standards Unit, Evaluation and Standards Laboratory Centre of Infection. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/food/pdf/F13.pdf> 18 Juni: 18 hlm. 15 Januari 2008:21.00 WIB
13. Medici DD, Croci L, Delibato E, Pasquale S, Filetici E, Toti L. 2003. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR to Detect Salmonella enteritica Serotype Enteritidis in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6):3456-3461.
14. Herich R, Laukova A, Stompfova V, Revejova V, Levkut M, Pistl J. 2004. Optimization of Salmonella detection in chickens'

- caecum using PCR method (short communication).
Arch.Tierz.,Dummerstorf 47 1: 8-91.
15. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2002. Jawetz, Melnick & Adelberg's
Medical Microbiology 22nd ed. McGraw Hill, India: 225-228
16. Bruschi JL. 2006. Typhoid Fever. <http://www.emedicine.com/MED/topic2331.htm>. 24 juli: 24 hlm. 1 Januari 2007: 12.00
17. Boyd RF, Marr JJ. 1980. Medical Microbiology 1st ed. : Little, Brown
and Company, Boston 356-359
18. Kenneth Todor University of Wisconsin Madison Department of
Bacteriology. 2005. Salmonella and Salmonellosis.
www.textbookofbacteriology.net/salmonella.htm. 11 hlm. 26 Des
2007:17.00
19. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Willett CM. 1992. Zinser
Microbiology. Appleton & Lange, United State of America: 559-563
20. Shanson DC. 1982. Microbiology in Clinical Practice. John Wrigth &
Sons: England: 261-265
21. Merck Manual Professional. 2005. Salmonella Infection.
<http://www.merck.com/mmpe/print/sec14/ch173/ch173p.html>. Nov:
3hlm. 26 des 2007:17.00
22. Karsinah, Lucky H.M., Suharto, Mardiasuti H.M. 1994. Batang Negatif
Gram. Dalam: Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas
Indonesia. 1994. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran edisi revisi.
Binarupa Aksara, Jakarta: 168-173

23. Bauman RW. 2003. Microbiology. Peason Benjamin Cumming, San Francisco: 577-579
24. Mills SD, Finlay BB. 1995. Virulence Factors of Salmonella typhi. Dalam: Sarasombat S, Senawang S (ed). 1995. Second Asia Pacific Symposium on Typhoid Fever and Other Salmonellosis. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 26(2): 102-105
25. Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. 1992. Molecular and Functional Characterization of Salmonella Invasion Gene InvA : Homology of InvA to Members of a New Protein Family. Journal of Bacteriology. 174 (13): 4338-4349.
26. Galan JE, Sansonetti PJ. 1996. Molecular and Celluler Bases of Salmonella and Shigella Interaction with Host Cells. Dalam: Neidhardt FC. Escherichia coli and Salmonella Celluler and Molecular Biology 2nd edition volume 2. Washington DC: ASM Press. 2765-2768
27. Anonim. 2003. Plasmid DNA Isolation. http://www.everything2.com/?node_id=1483655. 11 Agustus : 2 hlm. 9 Mei 2008: pk. 10.00
28. Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: 1.44-1.54, 5.2-5.17
29. Saiki RK. 1990. Amplification of Genomik. Dalam: Innis, Michael A. PCR Protocol: A Guide to Methods and Application. Academic Press Inc. San Diego: 13-20

30. Haque A, Ahmed J, Qureshi JA. 1999. Early Detection of Typhoid by Polymerase Chain Reaction. *Annals of Saudi Medicine* 19(4): 337-340
31. Podzorski RP, Persing DH. 1995. Molecular Detection and Identification of Microorganism. Dalam: Murray PR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press. 130-137
32. Nester EW, Anderson GA, Robert CE, Pearsall NN, Nester MT. 2001. *Microbiology A Human Perspective* 3th edition. Mc Graw Hill Companies Inc, New York : 273-279
33. Lin L, Gong T, Metchette K, Cimino GD, Fearst JE, Isaacs ST. 1993. Simple and Rapid Sample Preparation Method for Whole Blood and Blood Plasma. Dalam: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (ed). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Application*. Washington DC: American Society for Microbiology : 605-608
34. Keller GH, Manak MM. 1993. DNA Probes background, Applications, procedures. Macmillan Publisher Ltd, England: 258-262
35. Winfrey MR, Rofit MA, Wortman AT. 1997. Unraveling DRA. *Molecular Biology for The Laboratory*. Prentice-Hall Inc, New Jersey: (42-43,285-290)
36. Shallom S. 2007. *Salmonella typhimurium*. <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/typhimurium.html> 31 Januari 22008: 19.40 WIB.

37. Anonim. 1980. Handbook of Microbiology. Darmastat: E Merck: 303, 308, 369-371
38. Malik A, Ariestanti D, Nurfachtiyani A, Yanuar A. 2008. Skrining Gen Glukosil Transferase (gtf) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. Makara (Seri Sains). 16 (in press)
39. Reynold J, Farinha M. 2005. Counting Bacteria. www.Hc.dccd.edu/mathsci/reynolds/mikcro/lab_manual/numbers.pdf . Juni: 10 hlm. 14 februari 2008: 20.30 WIB
40. Kiiyukia C. 2003. Laboratory Manual of Food Microbiology for Ethiopian Health and Nutrition Reasearch Institute (Food Microbiology Laboratory). Unido Project: 28-33, 75-80
41. Naravaneni R, Jamil K. 2005. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. J. Med Microbiol 54 (2005): 51-54
42. Castagna SMPF, Muller M, Macagnan M, Rodenbusch CR, Canal CW, Cardoso. 2005. Detection of Salmonella sp. from Porcine origin: a comparison between a PCR method and standart microbial techniques. Brazilian Journal of Microbiology 36 (2005): 373-377
43. Nuraeni U. 2007. Pengembangan metode deteksi bakteri Salmonella typhi dan Salmonella paratyphi A dalam makanan dengan metode polymerase chain reaction multipleks. Undergraduates Theses from JBPTITBFA. <http://top/s2-thesis/2007/jbptitbfa-gdl-s1-2007-uminuraeni-1915.htm> 19 Februari 2008: 17.00 WIB
44. Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kesehatan. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. 203-210

45. Persing DH. 1993. In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. Dalam: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (ed). Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Application. Washington DC: American Society for Microbiology. 51-59
46. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2002. Microbiology an Introduction Media Update. San Francisco: Benjamin Cumming. 156-159, 164-166, 173-174
47. Radstrom P, Wolffs P, Knutson R, Pastovora K, Kmet V, Malorny B, Tassios PT. 2003. Guideline for the purification of bacterial DNA for use in polymerase chain reaction. http://www.pcr.dk/guideline_for_the_purification_o.htm. 20 April 2008: 11.30
48. Kwok S. 1990. Procedur to Mimize PCR-Product Carry-Over. Dalam: Dalam: Innis, Michael A, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ. PCR Protocol: A Guide to Methods and Application. Academic Press Inc, San Diego: 142-145
49. Greenfield L, White TJ. 1993. Sample Preparation Methods. Dalam: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (ed). Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Application. Washington DC: American Society for Microbiology. 124-127
50. Baylis CL, MacPhee S, Betts RP. 1998. Comparison of two commercial preparation of buffered peptone water for the recovery and growth of Salmonella bacteria from foods. Journal of Applied Microbiology 89 (3): 501-511

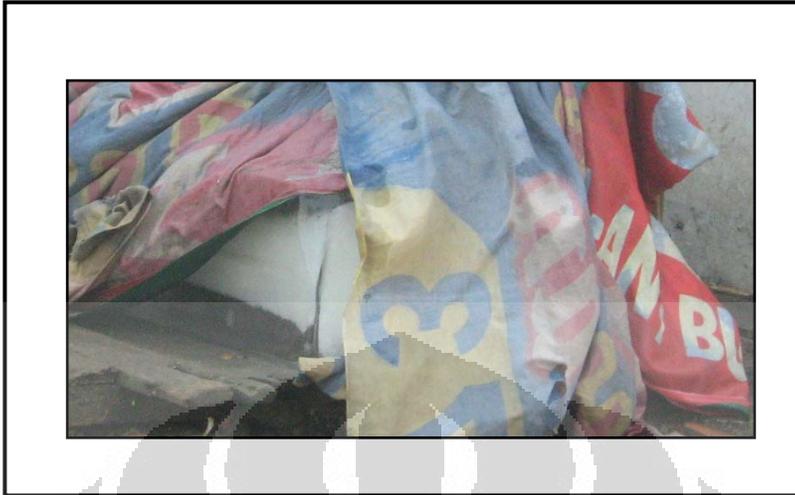
51. Anonim. Gram Negative Bacteria. <http://academic.pg.cc.md.us/~kroberts/web/gneg/gneg.htm>. 9 Juni 2008: 17.00 WIB
52. Brito CFA, Carvalho CMB, Santos FR, Gazzinelli RT, Oliveira SC, Azevedo V, Teixeira SMR. 2004. Molecular mechanisms associated with pathogenicity. Genetic and Molecular Research 3(1): 148-161
53. Anonim. 1999. Principle of The PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. 10 Mei 2008: 17.00 WIB
54. Anonim. Ethidium Bromide. <http://www.madsci.org/posts/archives/feb99/919869466.Mb.r.html>. 10 Mei 2008: 17.15 WIB
55. Levinson SA, MacFate RP. 1980. Clinical Laboratory Diagnosis. Lea & Febiger, Philadelphia: 941-942
56. Fermentas Life Science. 2006-2007. Molecular Biology Catalog and Product Application: 221



Gambar 1. *Salmonella typhi* dengan pewarnaan gram negatif, dengan perbesaran 3000x (51)



Gambar 2. Makanan dan Minuman yang dijual pedagang kaki lima di Jalan Margonda Raya, Pondok Cina, Depok



Gambar 3. Depo Penyimpanan es batu



Gambar 4. Mesin PCR [MJ Mini Biorad]



Gambar 5. Mikrosentrifuse berpendingin [Sorvall Fresco]



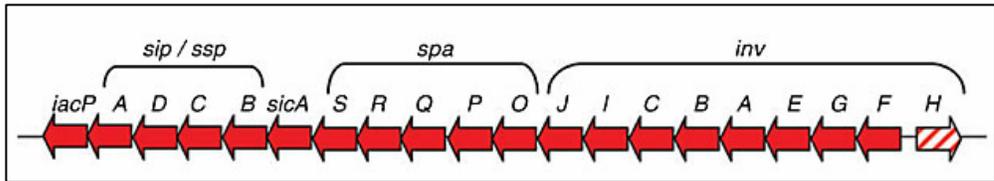
Gambar 6. Alat Mikrosentrifus Minispin [Eppendorf]



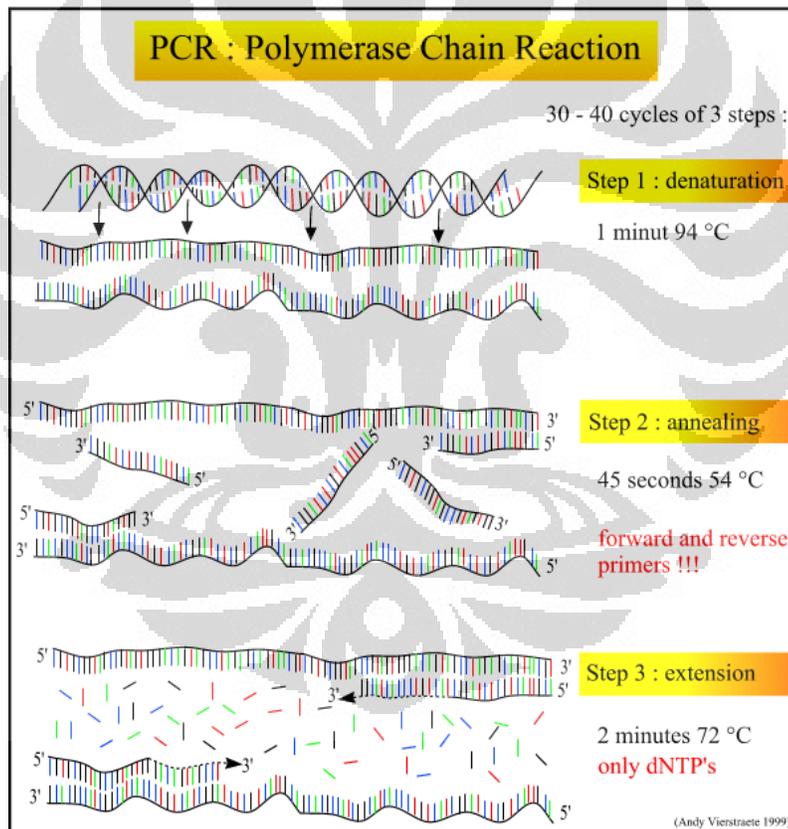
Gambar 7. Alat elektroforesis Gel Agarosa [mupid-ex Advance]



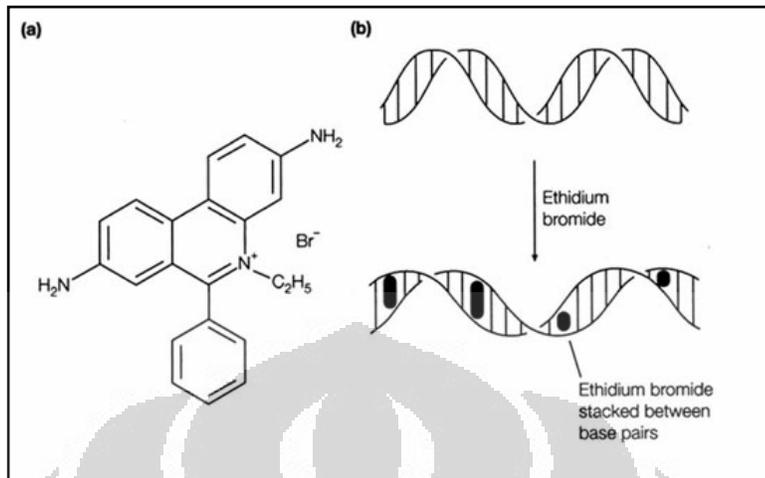
Gambar 8. UV Transluminator [BDA Biomtra TI1]



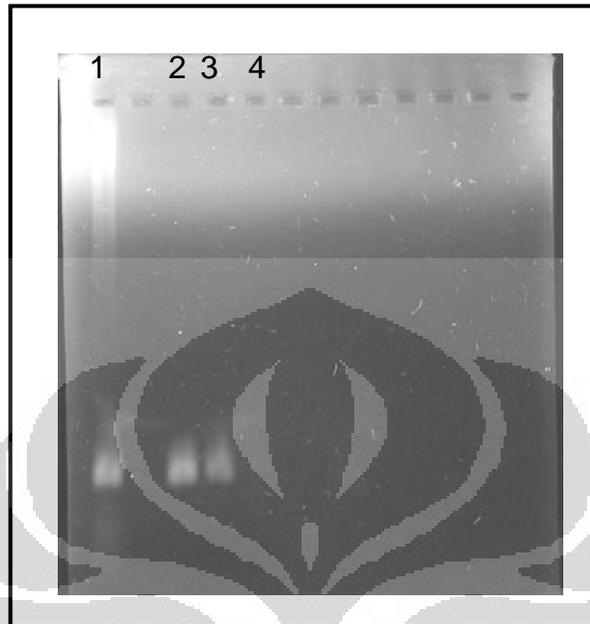
Gambar 9. Skema Plasmid *Salmonella* yang mengandung *locus inv* dan terdapat gen *invA* (52)



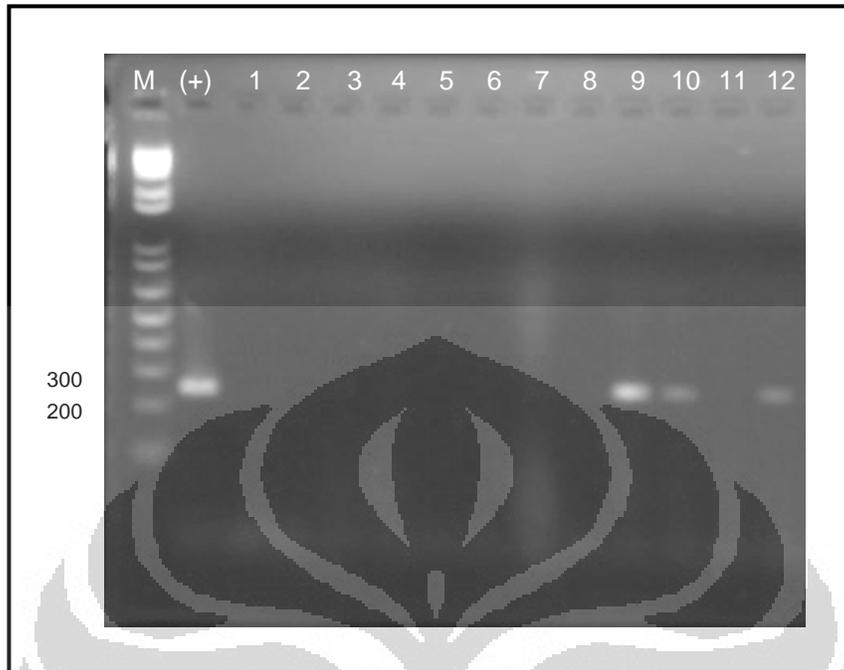
Gambar 10. Skema Polymerase Chain Reaction (PCR) (53)



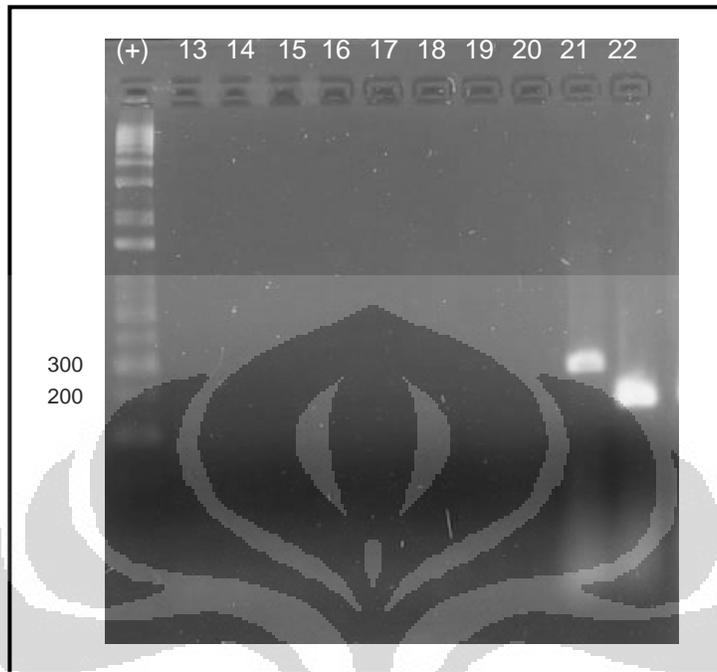
Gambar 11. (a). Etidium bromida; (b). Skema Interkalasi DNA oleh Etidium Bromida (54)



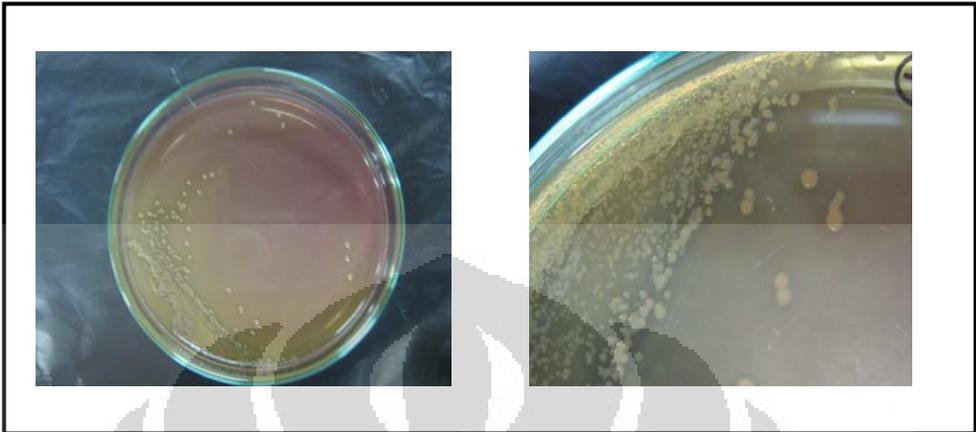
Gambar 12. Hasil deteksi *Salmonella* dengan primer *invA* menunjukkan amplicon pada elektroforesis gel agarosa. 1. Produk PCR dengan ekstraksi DNA *Salmonella* menggunakan metode CTAB; 2. Produk PCR dengan ekstraksi DNA *Salmonella* menggunakan metode *boiling* dengan konsentrasi 10^7 CFU (kultur); 3. konsentrasi 10^6 CFU (pengenceran 10^{-1}); 4. Konsentrasi 10^5 CFU (pengenceran 10^{-2}).



Gambar 13. Hasil deteksi *Salmonella* dengan primer *invA* menunjukkan amplikon sekitar 244 pb. M. 1 kb plus DNA ladder; (+). Kontrol positif *Salmonella typhi*; 1. DGRBg; 2. GSRG; 3. DGB; 4. GSB; 5. GDG; 6. KSD; 7. UP; 8. KBD; 9. SKMSPC; 10. SKMDG; 11. SKMBD; 12. SBGS.



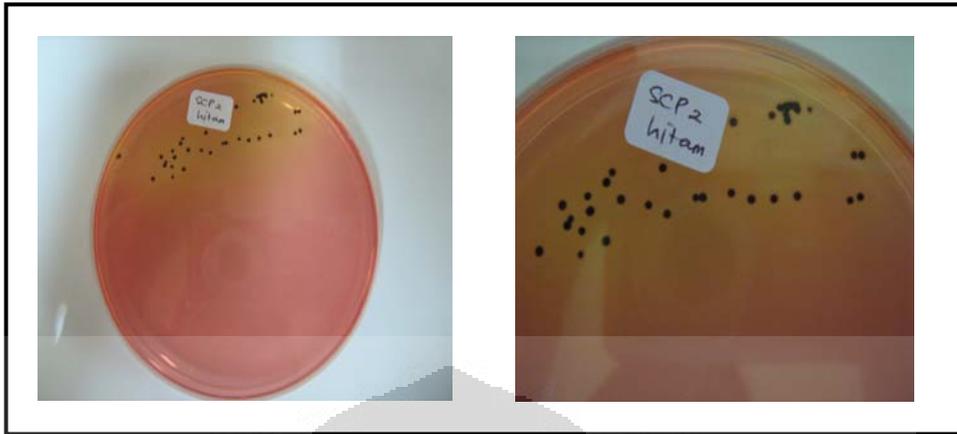
Gambar 14. Hasil deteksi *Salmonella* dengan primer *invA* menunjukkan amplicon sekitar 244 pb. M. 1 kb plus DNA ladder; 13.SDFKM; 14. SCK; 15.SCi; 16. SKM; 17.SCP; 18. STP; 19.TB; 20. TA; 21. SKMDGU; 22. SCP menggunakan kombinasi metode kultur standar dan PCR



Gambar 15. Koloni *Salmonella typhi* dalam media agar *Salmonella Shigella*



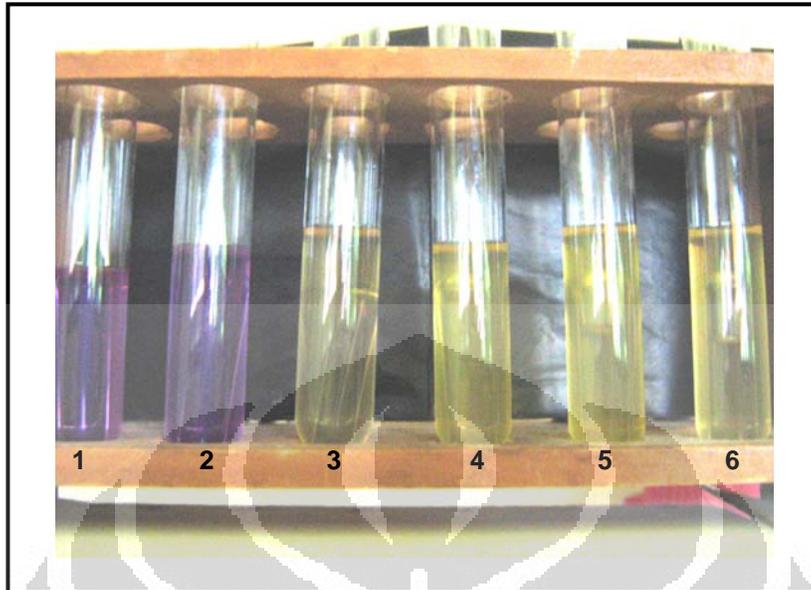
Gambar 16. Sampel SCP pada Agar *Salmonella Shigella*



Gambar 17. Sampel SCP2 setelah diisolasi kembali pada Agar *Salmonella Shigella*



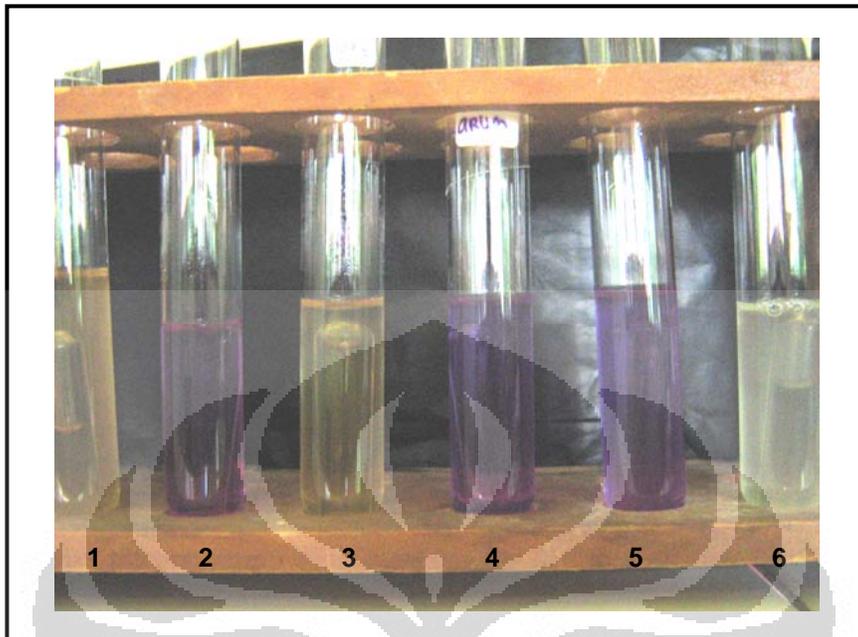
Gambar 18. Kontrol Positif *Salmonella typhi* pada
1. TSIA; 2. Laktosa; 3. Glukosa; 4. Sukrosa



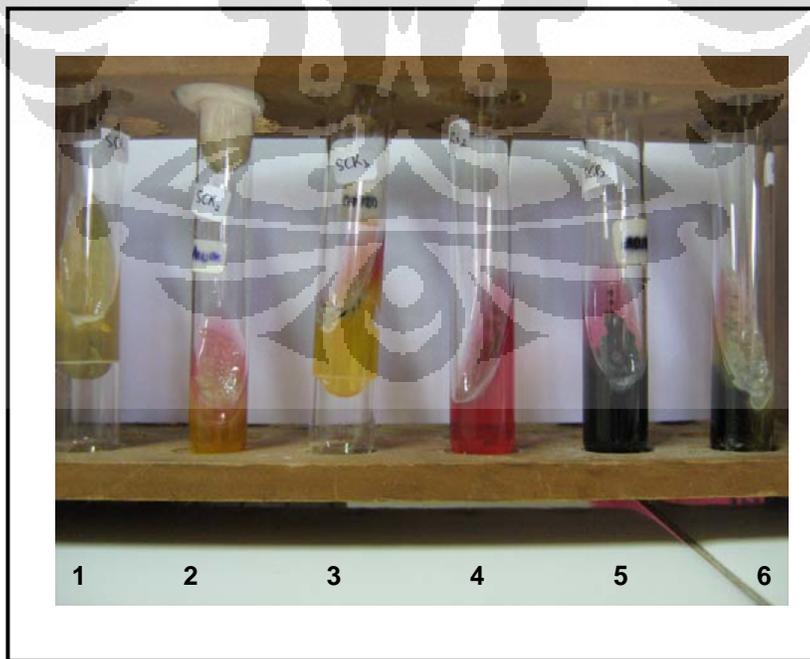
Gambar 19. Uji Biokimia Laktosa 1. SCi2; 2. SCP2;
3. SCP3; 4. SKM1; 5. SKM2; 6. TA



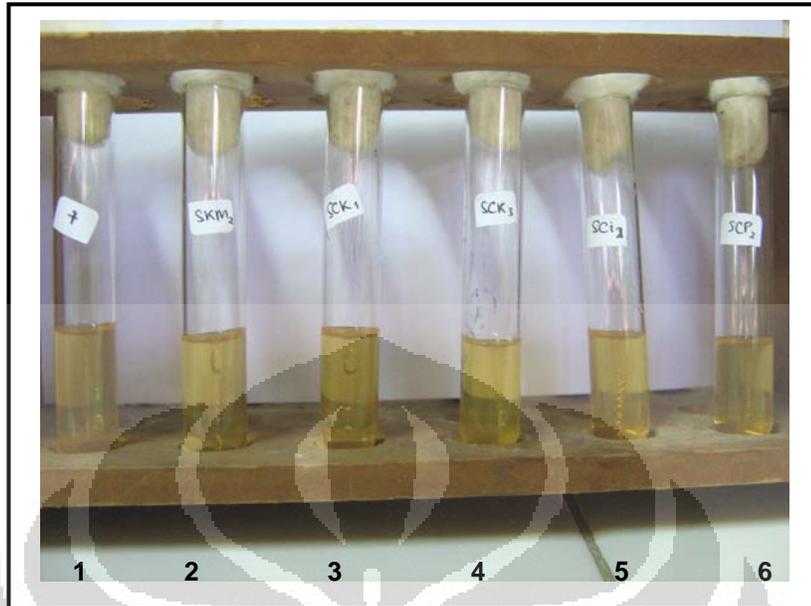
Gambar 20. Uji Biokimia Glukosa 1. STP; 2. SCi2; 3.
SCP2; 4. SCP3



Gambar 21. Uji Biokimia Sukrosa 1. SCK1; 2. SCK2; 3. SCK3; 4. SC2; 5. SCP2; 6. SCP3



Gambar 22. Uji Biokimia TSIA 1. SCK1; 2. SCK2; 3. SCK3; 4. SC2; 5. SCP2; 6. SCP3



Gambar 23. Uji Biokimia Urea 1. Kontrol (+); 2. SKM₂; 3. SCK₁; 4. SCK₂; 5. SCK₃; 6. SCP₂

Tabel 1

Perbedaan Bakteri *Salmonella*, *Shigella* dan *Escherichia coli* menggunakan metode biokimia adalah (17,55). :

Tes	Salmonella	Shigella	E. coli
Triple Sugar	- / +	- / -	+ / +
Iron	(slope : tetap merah / dasar : merah → kuning) H ₂ S + : inti hitam	H ₂ S -	H ₂ S -
Glukosa	+ (asam) dan gas	-	+
Laktosa	-	-	+
Sukrosa	-	-	Berbeda tipe biokimia
Manitol	+	+ / -	+
Sorbitol	+	Berbeda tipe biokimia	+
Urea	-	+	-
Motilitas	+	-	+ / -

Tabel 2
Pasangan Primer PCR yang Telah Diuji untuk Identifikasi *Salmonella* (13)

Gen Target	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran (pb)	Referensi
16S rDNA	TGT TGT GGT TAA TAA CCG CA CAC AAA TCC ATC TCT GGA	574	Lin dan Tsen (1996)
Gen invasi SPI1	CTG CCG CAG TGT TAA GGA TA CTG TCG CCT TAA TCG CAT GT	497	Guo et al. (2000)
Gen enterotoxin	CTT TGG TCG TAA AAT AAG GCG TGC CCA AAG CAG AGA GAT TC	260	Makino et al. (1999)
Fragmen DNA repetitif	GAT CAT CCA TTC GGC ATT AAA CA CTC AGC GAC GGA AGG GTA AAT C	199	Jitrapakde et al. (1995)
Gen invasi (<i>invA</i>)	GCT GCG CGC GAA CGG CGA AG TCC CGG CAG AGT TCC CAT T	389	Ferretti et al. (2001)
Gen <i>fur-regulated</i> (<i>iro B</i>)	TGC GTA TTC TGT TTG TCG GTC C TAC GTT CCC ACC ATT CTT CCC	606	Baumber at al. (1997)
Histidin <i>transport operon</i>	ACT GGC GTT ATC CCT TTC TCT GGT G ATG TTG TCC TGC CCC TGG TAA GAG A	496	Cohen et al (1997)
Gen penghubung <i>sipB</i> dan <i>sipC</i>	ACA GCA AAA TGC GGA TGC TT GCG CGC TCA GTG TAG GAC TC	250	Carlso et al. (1999)
Multipleks - gen invasi (<i>invA</i>)	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT	244	Chiu dan Ou (1996)
Multipleks – gen plasmid virulen (<i>spvC</i>)	ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC ATC A	571	

Tabel 3
Rentang Efisiensi Pemisahan pada Gel Agarosa (26,40)

Konsentrasi Agarosa (%[b/v])	Rentang Ukuran DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabel 4
Penentuan Angka Kuman

Pengenceran	Jumlah Koloni	
	Cawan 1	Cawan 2
10^{-6}	31	26
10^{-7}	4	6
10^{-8}	-	-
10^{-9}	-	-

Tabel 5
Sumber, Lokasi dan Waktu Pengambilan Sampel

No	Sampel	Sumber	Lokasi Pengambilan	Waktu Pengambilan
1.	DGRBg	Rujak	Jl Margonda Raya Pondok Cina	4 Maret 2008
2.	GSRG	Rujak	Kios Belakang Depok Town Square	4 Maret 2008
3.	DGB	Buah	Jl. Margonda Raya Pondok Cina	4 Maret 2008
4.	GSB	Buah	Gg. Senggol Pondok Cina	4 Maret 2008
5.	GDG	Gado-gado	Jl. Margonda Raya Pondok Cina	11 Maret 2008
6.	KSD	Karedok	Kios Belakang Depok Town Square	11 Maret 2008
7.	UP	Urap	Kios Stasiun Pondok Cina	11 Maret 2008
8.	KBD	Karedok	Kios Stasiun Pondok Cina	11 Maret 2008
9.	SKMSPC	Es Kelapa Muda	Stasiun Pondok Cina	24 Maret 2008
10.	SKMDG	Es Kelapa Muda	Jl. Margonda Raya Pondok Cina	24 Maret 2008
11.	SKMBD	Es Kelapa Muda	Kios Belakang Depok Town Square	24 Maret 2008
12.	SBGS	Es Buah	Gg Senggol Pondok Cina	24 Maret 2008
13.	SDFKM	Es Doger	Gg. Senggol Pondok Cina	24 Maret 2008

Tabel 5 (lanjutan)

No.	Sampel	Sumber	Lokasi Pengambilan	Waktu Pengambilan
14.	SCK	Es Cendol	Jl Margonda Raya Kober	2 April 2008
15.	SCi	Es Cincau	Jl. Margonda Raya Kober	2 April 2008
16.	SKM	Es Kelapa Muda	Jl. Margonda Raya Pondok Cina	2 April 2008
17.	SCP	Es Cendol	Jl. Margonda Raya Pondok Cina	2 April 2008
18.	STP	Es Teh	Kios Stasiun Pondok Cina	2 April 2008
19.	TB	Jamu dan telur bebek	Jl Margonda Raya Pondok Cina	1 April 2008
20.	TA	Jamu dan telur ayam	Jl Margonda Raya Pondok Cina	1 April 2008
21.	SKMDGU	Es Kelapa Muda	Jl Margonda Raya Pondok Cina	2 April 2008

Tabel 6
Hasil Metode Kultur Standar Sampel

No	Sampel	Koloni SSA	Laktosa	Glukosa	Sukrosa	TSIA	Urea	Hasil
	(+)	Translue	(-)	(+)	(-)	Slant : pink Butt : kuning Dg pigmen hitam	(-)	Terdeteksi
	(-)	(-) / tidak tumbuh	x	x	x	x	x	(-)
1.	DGRBg	Merah muda	(-)	(+)	x	Kuning dg gas	x	Tidak terdeteksi
2.	GSRG	(-) / tidak tumbuh	x	x	x	x	x	Tidak terdeteksi
3.	DGB	Pigmen hitam	(+) / gas	(+) / gas	x	Kuning dg gas	x	Tidak terdeteksi
4.	GSB	Sdkt pigmen hitam	(+) / gas	(+)	x	Kuning dg gas dan sedikit pigmen hitam	x	Tidak terdeteksi
5.	KBD	(-) / tidak tumbuh	x	x	x	x	x	Tidak terdeteksi
6.	GDG	Koloni pinkj	(+) / gas	(+) / gas	(+) / gas	Kuning dg gas	(-)	Tidak terdeteksi
7.	UP	UP1: koloni dg pigmen hitam	(+) / gas	(+) / gas	(+) / gas	Kuning dg gas	(-)	Tidak terdeteksi
		UP2: koloni translue	(+) / gas	(+) / gas	(+) / gas	Kuning dg gas	(-)	Tidak terdeteksi

Tabel 6 (lanjutan)

No	Sampel	Koloni SSA	Laktosa	Glukosa	Sukrosa	TSIA	Urea	Hasil
8.	KSD	KSD1: koloni coklat besar	(-)	(+)	(-)	Slant: merah Butt: kuning	(+)	Tidak terdeteksi
		KSD2: koloni translusen kecil	(-)	(+) / gas	(-)	Slant: merah Butt: kuning	(+)	Tidak terdeteksi
9.	SKMSPC	Koloni translusen	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
10	SKMDG	SKMDG1: koloni pink	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
		SKMDG2: koloni translusen dg pigmen hitam	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
11	SKMBD	SKMBD1: koloni merah muda	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
		SKMBD2: koloni translusent	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
12.	SDFKM	Koloni merah muda	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi

Tabel 6 (lanjutan)

No	Sampel	Koloni SSA	Laktosa	Glukosa	Sukrosa	TSIA	Urea	Hasil
13.	SBGS	Koloni translusen dg sedikit warna pink	(+)	(+)	(+)	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
14.	SCK	SCK1: koloni hitam	(+)	(+) / gas	(+) / gas	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
		SCK2: merah muda	(+)	x	(-)	Slant : merah Butt : kuning	x	Tidak terdeteksi
		SCK3: translusen	(+) / gas	(+) / gas	(+)	Kuning dg gas	(-)	Tidak terdeteksi
15.	SCi	SCi1: koloni coklat	x	x	x	x	x	Tidak terdeteksi
		SCi2: kol. translusen	(-)	(-)	(-)	merah (koloni coklat)	(-)	Tidak terdeteksi
16.	SKM	SKM1: merah muda	(+) / gas	x	(+)	Kuning	x	Tidak terdeteksi
		SKM2: translusen	(+) / gas	(+) / gas	(+) / gas	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi

Tabel 6 (lanjutan)

No	Sampel	Koloni SSA	Laktosa	Glukosa	Sukrosa	TSIA	Urea	Hasil
17.	SCP	SCP1: pink	x	x	x	x	x	Tidak terdeteksi
		SCP2: hitam	(-)	(+) / gas	(-)	slant : merah dg pigmen hitam	(-)	Terdeteksi
		SCP3: translusen	(+)	(+)	(+)	slant : merah butt: kuning	(+)	Tidak terdeteksi
18.	STP	Koloni coklat	(-)	(-)	(-)	Merah (koloni coklat)	(-)	Tidak terdeteksi
19.	TB	Koloni merah muda	(+)	(+) / gas	(+) / gas	Kuning	(-)	Tidak terdeteksi
20.	TA	Koloni merah muda	(+) / gas	(+) / gas	(+) / gas	Kuning dg gas	(-)	Tidak terdeteksi
21.	SKMDGU	SKMDGU1: transl.	(-)	(+)	(+)	Kuning	x	Tidak terdeteksi
		SKMDGU2: coklat	(+) / gas	(+) / gas	(+)	Kuning	x	Tidak terdeteksi
		SKMDGU3: merah muda	(-)	(+)	(+)	Kuning	x	Tidak terdeteksi

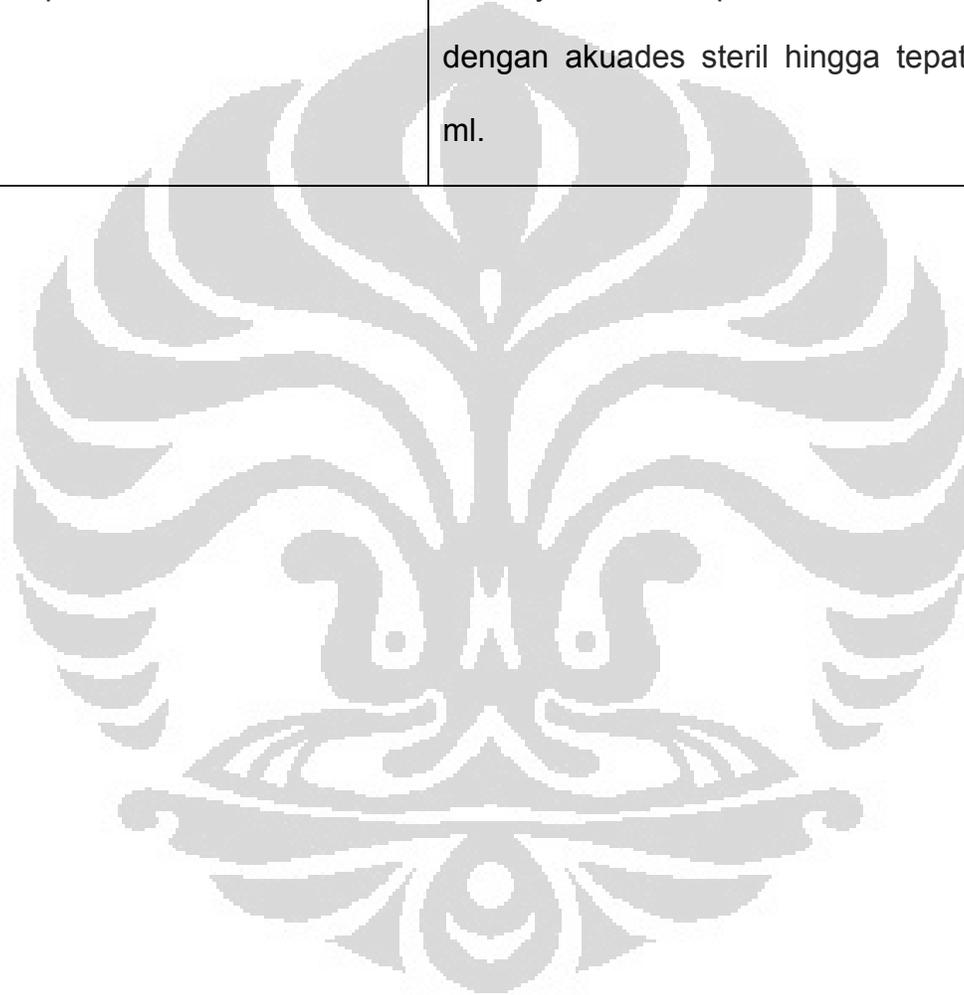
Lampiran 1

Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian (28)

No.	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Sodium dodesil sulfat 10%	Sebanyak 10 g sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 ml
2.	Natrium klorida 4 M	Sebanyak 93,6 g natrium klorida dilarutkan dalam akuades hingga tepat 400 ml. Lalu larutan disterilisasi dalam autoklaf pada 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit
3.	Dapar STET	Sebanyak 32 g sukrosa, 2,42 g tris base, dan 7,448 g EDTA dilarutkan dalam sejumlah akuades. Lalu ditambahkan 0,4 ml Triton X-100 kedalam larutan tersebut dan dikocok hingga homogen. pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian ditambahkan akuades hingga tepat 400 ml dan disterilisasi dalam autoclaf pada suhu 121oC, tekanan 1 atm, selama 15 menit.

4.	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (CTAB)	Sebanyak 2,925 g natrium klorida dilarutkan dalam akuades secukupnya. Sebanyak 5 g CTAB dilarutkan dalam akuades dengan cara memasukkan CTA sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan dipanaskan dalam <i>hotplate</i> . Lalu dimasukkan larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya ke dalam larutan CTAB dan ditambahkan dengan akuades hingga tepat 100 ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
5.	Proteinase-K	Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 ml air ddH ₂ O sambil divortex. Larutan disimpan dalam <i>freezer</i>
6.	Lisozim	Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 ml Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0. Larutan disimpan dalam <i>frezeer</i>
7.	Dapar Tris Borat EDTA 5X	Sebanyak 54 gram Tris base, 27,5 asam borat dan 20 ml EDTA 0,5 M dilarutkan dalam akuades. Lalu pH larutan

8.	Dapar Tris Borat EDTA 0,5X	d disesuaikan dengan asam klorida 1 N dan ditambahkan akuades hingga 1000 ml. Kemudian larutan diautoklaf pada suhu 120C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Sebanyak 50 ml dapat TBE 5 X dilarutkan dengan akuades steril hingga tepat 500 ml.
----	----------------------------	--



Lampiran 2

Komposisi Medium (12,37)

Nutrient Agar (NA)

<i>Enzymatic Digest of Animal tissues</i>	1,0 g
<i>Agar</i>	5,0 g
<i>Water</i>	1 L
pH 7,0 \pm 0,2 pada 25°C	

Buffered Peptone Water

<i>Enzymatic digest of Casein</i>	10,0 g
<i>Sodium Chlorida</i>	5,0 g
<i>Disodium Hydrogen Phosphate Dodecahydrate</i>	9,0 g
<i>Potassium Dihydrogen Phosphate</i>	1,5 g
<i>Water</i>	1L
pH 7,0 \pm 0,2 pada 25°C	

Selenite Cystein Broth (SC)

<i>Tryptone</i>	5,0 g
<i>Lactose</i>	4,0 g
<i>Isodium Phosphate</i>	10,0 g
<i>L-Cystine</i>	10 mg
<i>Sodium Biselenite</i>	4,0 g
<i>Water</i>	1L

pH 7,0 \pm 0,2 pada 25°C

Salmonella Shigella Agar

<i>Meat extract</i>	5,0 g
<i>Peptone</i>	5,0 g
<i>Lactose</i>	10,0 g
<i>Bile Salt</i>	8,5 g
<i>Sodium Citrate</i>	10,0 g
<i>Sodium thiosulphate</i>	8,5 g
<i>Ferric citrate</i>	1,0 g
<i>Brilian green</i>	0,00033 g
<i>Neutral red</i>	0,025 g
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Water</i>	1 L
pH 7,0 (\pm 0,2)	

Triple Sugar iron (TSI)

<i>Meat Eztract</i>	3,0 g
<i>Enzymatic Digest of Casein</i>	20,0 g
<i>Yeast Extract</i>	3,0 g
<i>Sodium Chloride</i>	5,0 g
<i>Sodium Thiosulphate</i>	0,3 g
<i>Lactose</i>	10,0 g

<i>Sucrose</i>	10,0 g
<i>Glucose</i>	1,0 g
<i>Phenol Red</i>	0,024 g
<i>Agar</i>	12,0 g
<i>Water</i>	1L

pH 7,4 \pm 0,2 pada 25°C

Urea Agar

<i>Enzymatic Digest of Casein</i>	1,0 g
<i>Glucose</i>	1,0 g
<i>Sodium Chloride</i>	5,0 g
<i>Potassium dihydrogen phosphate</i>	5,0 g
<i>Phenol Red</i>	0,024 g
<i>40% urea solution</i>	50 mL
<i>Agar</i>	15,0 g
<i>Water</i>	1L

pH basis 6,8 \pm 0,2 pada 25°C

Lampiran 3

Perhitungan Penentuan Angka Kuman

$$\text{Angka kuman (CFU)} = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{Pengenceran} \times \text{jumlah inokulum (ml)}}$$

$$\text{Angka kuman (CFU)} = \frac{31}{10^{-6} \times 1}$$

$$= 3,1 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$$

$$\text{Angka kuman (CFU)} = \frac{26}{10^{-6} \times 1}$$

$$= 2,6 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$$

$$\text{Rata-rata Angka Kuman} = 2,85 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$$

Lampiran 4

Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses PCR

2X PCR Master Mix (56)

Untuk volume 25 μ l :

<i>Taq DNA Polymerase</i>	0,05 U/ μ l
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) masing-masing	0,4 mM
MgCl ₂	4 mM
Dapar reaksi	

1. Perhitungan campuran PCR menggunakan cetakan DNA *Salmonella* dengan metode CTAB

PCR <i>Master Mix</i>	25 μ l
Primer <i>invA1</i> 25 pmol/ μ l	2 μ l
Primer <i>invA2</i> 25 pmol/ μ l	2 μ l
ddH ₂ O	<u>15 μl</u> +
volume total	44 μ l

Volume total dibagi menjadi 2 mikrotube masing-masing 22 μ l

Campuran PCR	22 μ l
Cetakan DNA	<u>3 μl</u> +
Volume total reaksi	25 μ l

2. Perhitungan campuran PCR menggunakan cetakan DNA *Salmonella* dengan metode *boiling*

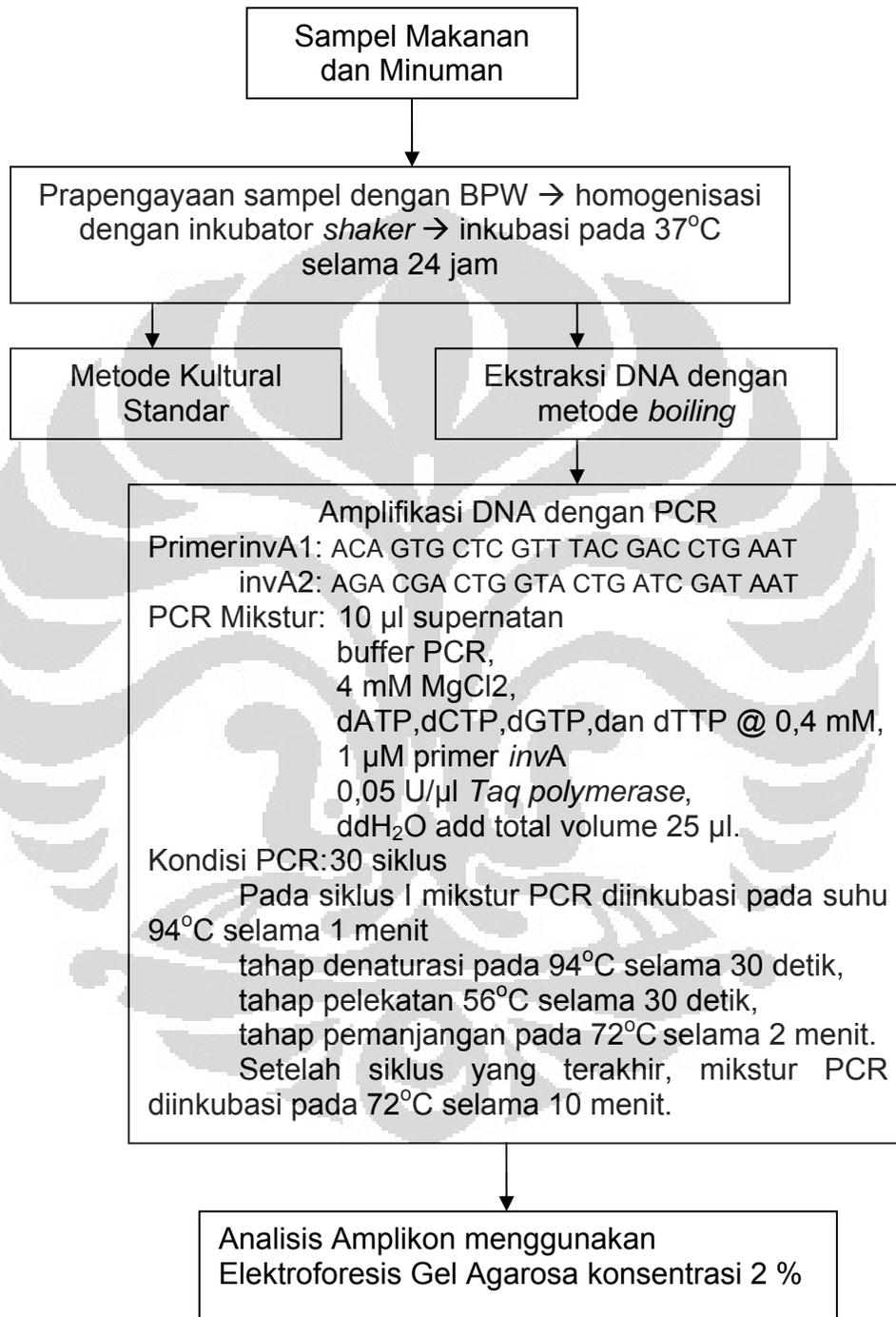
PCR <i>Master Mix</i>	25 μ l
Primer <i>invA1</i> 25 pmol/ μ l	2 μ l
Primer <i>invA2</i> 25 pmol/ μ l	2 μ l
ddH ₂ O	<u>1 μl</u> +
volume total	30 μ l

Volume total dibagi menjadi 2 mikrotube masing-masing 22 μ l

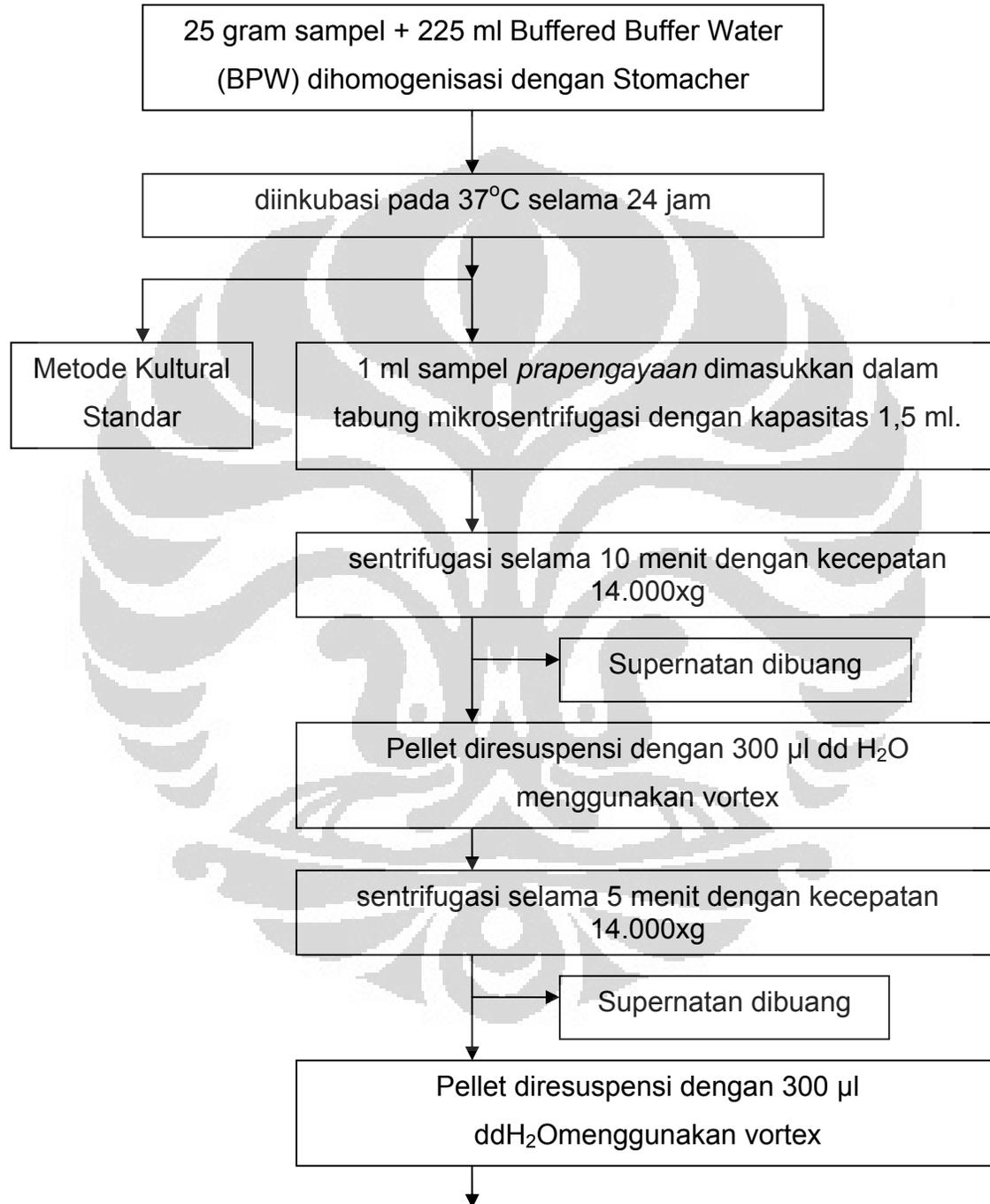
Campuran PCR	15 μ l
Cetakan DNA	<u>10 μl</u> +
Volume total reaksi	25 μ l

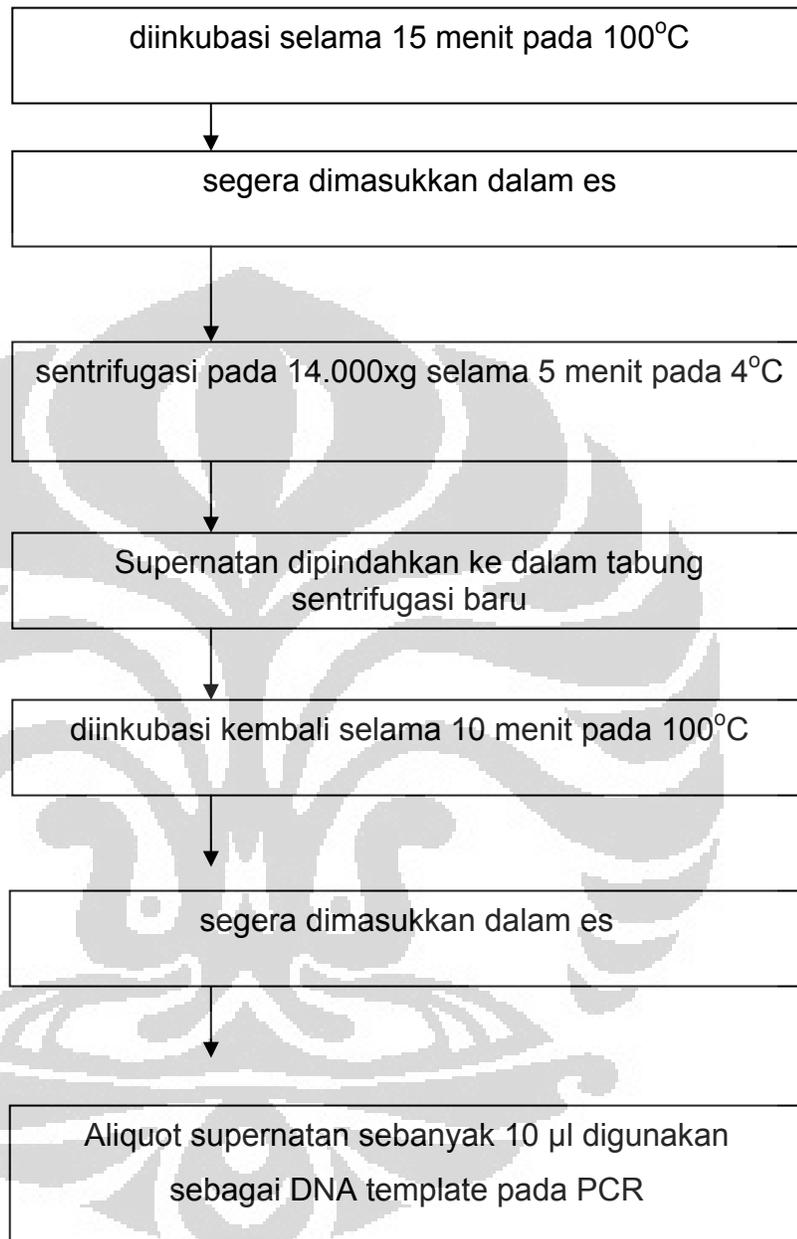
Lampiran 5

Skema Kerja Pengujian Sampel



Lampiran 6
Penyiapan Cetakan DNA *Salmonella* dalam makanan dan minuman dengan metode boiling





Lampiran 7

**Skema Metode Kultur Standar
Bakteri *Salmonella* dari Sampel Makanan**