

Al-Kimia

Preparasi Material Sensor Kreatinin dengan Metode *Molecularly Imprinted* Menggunakan Prekursor MBAA dan AMPSA

Karmanto, Ahmad Amjad Muzani

Synthesis of N-Benzenesulfonyl-*p*-Coumaramide from *p*-Coumaric Acid

Nasriadi Dali, Arniah Dali

Penurunan Konsentrasi BOD₅, COD dan Padatan Tersuspensi pada Air Limbah dengan Menggunakan Teknologi Lahan Basah Buatan (*Constructed Wetland*)

Philiphi de Rozari, Sherly M.F. Ledoh

Uji Aktivitas Antibakteri Limbah Kulit Pisang Kepok (*Musa acuminata x balbisiana*), Kulit Pisang Uli (*Musa Paradisiaca Sapientum*), dan Kulit Pisang Nangka (*Musa sp L*)

Andi Nursanti, Irma Herawati Suparto, Tetty Kemala

Analisis Flavonoid Total Akar Tabar Kedayan (*Aristolochia foveolata* Merr)

Siti Jubaidah, Henny Nurhasnawati

Analisis Komposisi Asam Lemak Dari Mikroalga Laut *Navicula salinicola*

Liska Ramdanawati, Dewi Kurnia, Vita Aji Kusumaning Tyas, Zeily Nurachman

Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella typhi* pada Sayuran Mentah Menggunakan Metode *nested Polymerase Chain Reaction*

Idar, Shinta Kusumawardhani, Mia Tria Novianti

Uric Acid Biosensor Based on Biofilm of *L. plantarum* using *Screen-Printed Carbon Electrode* Modified by Magnetite

Dian Siska RF, Deden Saprudin, Dyah Iswantini, Novik Nurhidayat

Kadar Fenolat dan Flavonoid Total serta Kapasitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*)

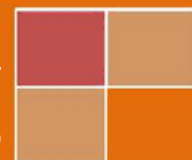
Dwi Koko Pratoko, Firdha Aprillia Wardhani, Nia Kristiningrum, Fifteen Aprilia Fajrin, Dian Agung Pangaribowo

Sintesis dan Karakterisasi Hidroksiapatit Dari Tulang Ikan Tuna (*Thunnus Albacores*) Dengan Xrf, Ftir, Dan Xrd

Sitti Chadijah, Hardiyanti, Sappewali

Penentuan Sifat Fisikokimia Madu Hutan (*Apis dorsata*) Sulawesi Selatan

Sjamsiah*, Rismawati Sikanna, Azmalaeni Rifkah.A, Asri



Al-Kimia

EDITOR IN CHIEF

Sjamsiah

MANAGING EDITOR

Aisyah

REVIEWER

Ambara Rahmat Pradipta

Sarifah Fauziah

Suminar Setiati Achmadi

Muharram

Safri Ishmayana

Desi harneti Putri Huspa

Ajuk Sapar

Muhammad Qaddafi

St .Chadijah

Asri Saleh

Asriyani Ilyas

SECTION EDITOR

Rani Maharani

Ummi Zahra

Firnanelty Rasyid

A.Nurfitriani Abubakar

Chusnul Chatimah **Asmad**

Satriani

PUBLISHER

Department of Chemistry

Faculty of Science and Technology

Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

Jl. H. M. Yasin Limpo No. 36 Gowa South Sulawesi Indonesia

E -mail: al-kimia@uin-alauddin.ac.id

Al-Kimia

TABLE OF CONTENT

Preparasi Material Sensor Kreatinin dengan Metode <i>Molecularly Imprinted</i> Menggunakan Prekursor MBAA dan AMPSA Karmanto, Ahmad Amjad Muzani	97-112
Synthesis of N-Benzenesulfonyl- <i>p</i> -Coumaramide from <i>p</i> -Coumaric Acid Nasriadi Dali, Arniah Dali	113-119
Penurunan Konsentrasi BOD ₅ , COD dan Padatan Tersuspensi pada Air Limbah dengan Menggunakan Teknologi Lahan Basah Buatan (<i>Constructed Wetland</i>) Philiphi de Rozari, Sherly M.F. Ledoh	120-128
Uji Aktivitas Antibakteri Limbah Kulit Pisang Kepok (<i>Musa acuminata x balbisiana</i>), Kulit Pisang Uli (<i>Musa Paradisiaca Sapientum</i>), dan Kulit Pisang Nangka (<i>Musa sp L</i>) Andi Nursanti, Irma Herawati Suparto, Tetty Kemala	129-134
Analisis Flavonoid Total Akar Tabar Kedayan (<i>Aristolochia foveolata</i> Merr) Siti Jubaidah, Henny Nurhasnawati	135-140
Analisis Komposisi Asam Lemak Dari Mikroalga Laut <i>Navicula salinicola</i> Liska Ramdanawati, Dewi Kurnia, Vita Aji Kusumaning Tyas, Zeily Nurachman	141-149
Deteksi Bakteri Patogen <i>Salmonella typhi</i> pada Sayuran Mentah Menggunakan Metode <i>nested Polymerase Chain Reaction</i> Idar, Shinta Kusumawardhani, Mia Tria Novianti	150-159
Uric Acid Biosensor Based on Biofilm of <i>L. plantarum</i> using <i>Screen-Printed Carbon Electrode</i> Modified by Magnetite Dian Siska RF, Deden Saprudin, Dyah Iswantini, Novik Nurhidayat	160-170
Kadar Fenolat dan Flavonoid Total serta Kapasitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Jahe Merah (<i>Zingiber officinale var. Rubrum</i>) Dwi Koko Pratoko, Firdha Aprillia Wardhani, Nia Kristiningrum, Fifteen Aprilia Fajrin, Dian Agung Pangaribowo	171-183
Sintesis dan Karakterisasi Hidroksiapatit Dari Tulang Ikan Tuna (<i>Thunnus Albacores</i>) Dengan Xrf, Ftir, Dan Xrd Sitti Chadijah, Hardiyanti, Sappewali	184-190
Penentuan Sifat Fisikokimia Madu Hutan (<i>Apis dorsata</i>) Sulawesi Selatan Sjamsiah, Rismawati Sikanna, Azmalaeni Rifkah.A, Asri Saleh	191-199

Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella typhi* pada Sayuran Mentah Menggunakan Metode *nested Polymerase Chain Reaction*

Idar^{*1}, Shinta Kusumawardhani², Mia Tria Novianti²

¹Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

²Pusat Riset Bioteknologi Molekuler dan Bioinformatika, Unpad

^{*}E-mail: idar@stfb.ac.id

Received: November, 16, 2018/Accepted:December,20, 2018
doi: 10.24252/al-kimia.v6i2.6263

Abstract: *Salmonella typhi* (*S. typhi*) infection is a zoonotic infection and known as salmonellosis. In the human body, salmonellosis causes an increase in high body temperature or known as typhoid fever that cause high morbidity and mortality in developing countries, especially Indonesia. It was found that out of 22 million cases of typhoid fever, 200 thousand of them ended in death. *S. typhi* often contaminates food that was consumed raw or not perfectly cooked, for example meat, eggs, dairy products, fruits and vegetables. The conventional method for detecting these bacteria is culture method which time consuming and need BSL 2 facilities. PCR was one of DNA based detection method that could overcome the culture method weakness. In this study conducted detection of *Salmonella* bacteria in raw vegetables which are usually consumed as fresh by using nested PCR method. The detection procedures were sample preparation; bacterial DNA isolation; amplification by using two sets of primer, ST1-ST2 in first round PCR and ST3-ST4 in second round PCR; and the characterization by using agarose electrophoresis. The results indicated that two of nine raw vegetables, tomatos and cabbages have been contaminated with *Salmonella*. We conclude that nested PCR could detect *Salmonella* contamination in raw vegetables.

Keywords: food safety, nested PCR, raw vegetables, *Salmonella thypi*.

1. PENDAHULUAN

Salmonella typhi (*S. typhi*) adalah salah satu bakteri patogen yang tersebar luas diberbagai belahan bumi dan secara umum sering mengkontaminasi pangan (Mahmoud, 2011). Kasus infeksi bakteri ini, ditemukan sekitar 540 kasus dari 100.000 populasi pada setiap tahunnya (Krishna, *et al.*, 2011). Infeksi bakteri merupakan infeksi zoonotik dan dikenal dengan istilah salmonellosis. Pada tubuh manusia, salmonellosis yang diakibatkan *S. typhi* menyebabkan peningkatan suhu tubuh yang cukup tinggi atau dikenal dengan nama demam tifoid. Demam tifoid diketahui merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas yang tinggi di berbagai negara, terutama negara berkembang, termasuk Indonesia. Ditemukan fakta bahwa dari 22 juta kasus demam tifoid, 200 ribu diantaranya berakhir dengan kematian (Crump, *et al.*, 2004). Sehingga berdasarkan berbagai investigasi, pengobatan dan pencegahan infeksi *S. typhi* ini memberikan pengaruh negatif terhadap perekonomian negara. Bakteri *Salmonella* dapat tumbuh dan berkembang biak pada hewan maupun manusia. Beberapa bahan pangan yang yang tidak dimasak sempurna juga biasa menjadi media tranmisi bakteri ini. Contoh bahan pangan yang sering ditempati *Salmonella* adalah daging, telur, produk susu, buah-buahan dan sayuran (Mahmoud, 2011).

Sampai saat ini, telah banyak pengembangan dan aplikasi metode deteksi *Salmonella* yang tersedia secara komersial. Berdasarkan prinsip kerjanya, metode deteksi tersebut dikelompokkan menjadi 5 metode uji, yaitu metode kultur, uji berbasis imunologi, uji berbasis asam nukleat, uji biokimia secara miniatur dan biosensor. Dari kelima prinsip tersebut, metode kultur termasuk ke dalam metode konvensional, sedangkan 4 metode berikutnya merupakan metode deteksi cepat (Lee, *et al.*, 2015). Diagnosis demam tifoid masih terus dikembangkan. Meskipun diagnosis dengan teknik kultur, masih merupakan standar emas, namun, kurang memadainya fasilitas pendukung untuk kultur dan terlalu lamanya waktu yang diperlukan, masih merupakan hambatan tersendiri.

Selain itu, terlalu mudahnya akses masyarakat terhadap penggunaan antibiotik tanpa resep dokter, menyebabkan kesulitan dalam isolasi mikroorganisme tersebut. Sehingga untuk mengatasinya dapat dilakukan dengan isolasi mikroorganisme melalui susum tulang, namun tidak mudah jika dilakukan sebagai pemeriksaan rutin (Hayati, *et al.*, 2011). Sehingga perlu dikembangkan metode deteksi dini demam tifoid dengan cara yang cepat juga akurat (Hasan, *et al.*, 2013).

PCR merupakan prosedur deteksi yang cepat dan sensitif dalam mengidentifikasi bakteri patogen yang spesifik yang mengkontaminasi bahan pangan. Sampai saat ini penggunaan PCR sebagai metode deteksi patogen masih menguntungkan dibanding metode konvensional, baik dari segi waktu maupun spesifitas (Ahmed, *et al.*, 2014). Salah satu daerah yang banyak diteliti dan diamplifikasi dengan metode PCR adalah daerah khas pada flagel, yaitu gen *fliC* (Hatta, *et al.*, 2011). Urutan gen yang sama dengan gen *fliC* ini juga terdapat pada gen protease dari *S. muenchen* (Frankel, *et al.*, 1989 dalam Bharmoria *et al.*, 2017). Kekurangan ini diatasi dengan kombinasi berbagai pasangan primer melalui PCR multipleks atau PCR nested. Pada beberapa penelitian primer PCR nested berhasil meningkatkan sensitifitas, walaupun menimbulkan amplifikasi kurang spesifik ataupun kontaminasi (Goay, *et al.*, 2016). Pada penelitian ini dilakukan deteksi *Salmonella* serovar *typhi* pada bahan pangan, yaitu sayuran yang biasa dikonsumsi mentah menggunakan teknik *nested* PCR.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Autoklaf (HIRAYAMA HVE-50); *Shaker*, KS-A SWIP; Mastercycler, Eppendorf type 5332; *transilluminator*, RAISER RS 3XA; *agarose electrophoresis*, BIO-RAD PowerPac™ Basic; *sentrifugator*, TOMY MX-305

Bahan

Sayuran (timun, kacang panjang, terong, tauge, tomat, tespong, kol, selada, kemangi), *Salmonella typhi*, *Eschericia coli*, Primer ST1, ST2, ST3, ST4 (*Integrated DNA Technologies*), kit isolasi DNA (*Thermo Scientific*), akuabidestilata steril (IKA pharmino), air bebas nuklease (*Thermo Scientific*), *ladder* 100 bp (*Thermo Fisher Scientific*), GeneRuler 1 kB DNA Ladder (*Thermo Fisher Scientific*), Tris-HCl (Merck), Asam asetat glasial (Merck), disodium EDTA (1st base) *loading buffer* (*Thermo Fisher Scientific*), agarose (1st base), gel red (Biotium), etanol (Merck), pepton (oxid), natrium klorida (Merck), disodium fosfat (Merck), potasium dihidrogen fosfat (Merck), *nutrient broth* (oxid), gliserol (Merck)

Prosedur Kerja

Analisis Penempelan Sekuen Primer pada Gen Target

Analisis penempelan primer dilakukan melalui analisis penjajaran urutan primer terhadap beberapa sekuen gen flagelin *Salmonella* galur Indonesia menggunakan program secara on line, CLUSTAL O (1.2.4) *multiple sequence alignment*. Gen flagelin *Salmonella* galur Indonesia didapatkan dari *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI).

Uji Spesifisitas Primer

Kultur Bakteri

Uji spesifisitas primer terhadap *Salmonella* (kontrol positif) dan *E. coli* (kontrol negatif). Kultur *Salmonella* diremajakan dengan mengambil 1 mL stok kultur dan dimasukkan ke dalam 9 mL *nutrient broth* (13 gram/Liter), kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang sambil dikocok. Sedangkan *E. coli* diremajakan dengan cara 1 mL stok kultur *E. coli* dimasukkan ke dalam 10 mL media Luria Bertani, kemudian di inkubasi selama 18 jam pada suhu ruang sambil dikocok.

Isolasi DNA

Salmonella (sebagai kontrol positif) dan *E. coli* (sebagai kontrol negatif) merupakan biakan murni yang diasumsikan menghasilkan jumlah genom yang cukup banyak sehingga isolasi DNA genom dilakukan dengan metode lisis cepat. Sebanyak 1 mL kultur bakteri dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian dilakukan sentrifugasi 2800xg selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk diambil. Tahap ini diulangi empat kali untuk mengumpulkan pelet. Setelah itu, pelet ditambahkan 180 μ L buffer lisis pH 8,0 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20), lalu ditambahkan 20 μ L Proteinase-K 1 mg/mL. Kemudian campuran reaksi diinkubasi pada suhu 55°C selama 60-90 menit. Setelah itu, campuran reaksi tersebut dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit. Hasil isolasi DNA pada tahap ini selanjutnya digunakan sebagai templat PCR.

Amplifikasi

Amplifikasi DNA *Salmonella* dilakukan dengan metode *nested* PCR melalui dua tahap. Tahap pertama dilakukan dengan cara campuran reaksi (8 μ L air bebas nuklease, 1 μ L primet ST1 20 pmol/ μ L, 1 μ L primet ST2 20 pmol/ μ L, 12,5 μ L Dream Taq Master Mix 2x, 2,5 μ L templat) di amplifikasi menggunakan PCR dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus (95°C selama 30 detik, 63°C selama 60 detik dan 72°C selama 60 detik), dan elongasi dilakukan pada 72°C selama 7 menit. Setelah itu, tahap kedua dilakukan dengan cara campuran reaksi (9 μ L air bebas nuklease, 1 μ L primet ST3 20 pmol/ μ L, 1 μ L primet ST4 20 pmol/ μ L, 12,5 μ L Dream Taq Master Mix 2x, 1,5 μ L templat hasil PCR tahap pertama) di amplifikasi menggunakan PCR dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus (95°C selama 30 detik, 61°C selama 60 detik dan 72°C selama 60 detik), dan elongasi dilakukan pada 72°C selama 7 menit.

Karakterisasi

Hasil PCR dikarakterisasi dengan menggunakan elektroforesis agarosa. Agarosa dipersiapkan dengan cara melarutkan 1 mg agarosa dalam 50 mL buffer TAE (2% b/v), kemudian dipanaskan sampai mendidih.

Setelah suhunya mencapai $\pm 60^{\circ}\text{C}$, segera dituangkan ke dalam cetakan yang telah diberi sisir, dan didiamkan sampai mengeras. Setelah gel agarosa siap, sumur-sumur pada gel diisi dengan masing-masing sampel, marker 100bp ladder, kontrol (+), kontrol (-) yang telah dicampur dengan 1 μl gelred terlebih dahulu, kecuali ladder. Setelah itu ke dalam sistem elektroforesis ditambahkan buffer TAE. Elektroforesis agarosa dijalankan dengan kondisi 80 volt, 80 mA, selama 45 menit. Pendaran hasil PCR dilihat pada transilluminator UV

Uji Kontaminasi Salmonella pada Sampel

Kultur Bakteri pada Sampel

Prosedur kultur dilakukan berdasarkan Ahmed *et al.*, (2014) dengan beberapa penyesuaian. Sebanyak sembilan jenis sayuran yang dikonsumsi mentah, yaitu timun, kacang panjang, terong, tauge, tomat, tespong, kol, selada dan kemangi, masing-masing ditimbang sebanyak 25 gram kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL media *Buffered Peptone Water* (BPW). Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu ruang sambil dikocok selama 24 jam. Supernatan masing-masing kultur dipisahkan dan diambil menggunakan setrifugasi 2800 g selama 15 menit.

Isolasi DNA

Isolasi DNA bakteri dari sampel dilakukan sesuai protokol purifikasi DNA genom bakteri gram negatif, *Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit*.

Amplifikasi dan Karakterisasi

Amplifikasi DNA dan karakterisasinya dilakukan menggunakan metode *nested PCR* dengan langkah yang sama seperti amplifikasi dan karakterisasi pada bagian B.

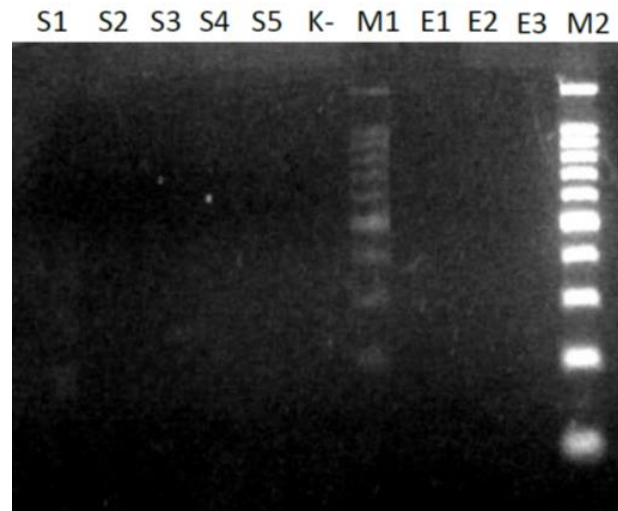
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Penempelan Sekuen Primer pada Gen Target

Berdasarkan hasil analisis penjajaran sekuen primer terhadap gen flagellin, didapatkan bahwa ST1 menempel pada urutan 1059-1076; ST2 menempel pada urutan 1504-1521; ST3 menempel pada urutan 1093-1112 dan ST4 menempel pada urutan 1439-1458 Gambar 1 (a). Dengan peta penempelan primer ditunjukkan oleh Gambar 1 (b).

Uji Spesifisitas Primer

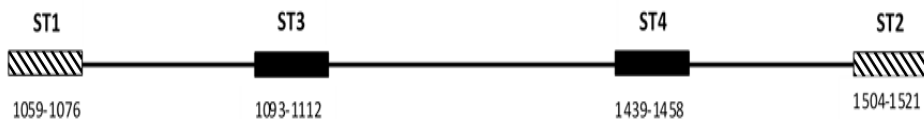
Untuk menguji spesifisitas primer PCR (ST1, ST2, ST3, ST4), dilakukan PCR *nested* pada *Salmonella typhi* (*S. typhi*) sebagai kontrol positif dan *Escherichia coli* (*E. coli*) sebagai kontrol negatif (Gambar 1 dan 2). PCR tahap pertama menggunakan pasangan primer ST1 dan ST2, *S. typhi* menghasilkan produk PCR bobot 458 bp. Namun pada elektroforegramnya tidak muncul pita dengan bobot molekul tersebut (Gambar 2). Diduga bahwa produk PCR yang terbentuk sedikit sehingga tidak terdeteksi.



Gambar 1. Elektroforegram PCR tahap pertama dari *Salmonella typhi*. Dimana *S. typhi* sebagai kontrol positif (S1, S2, S3, S4, S5); *E. coli*, sebagai kontrol negatif (E1, E2, E3); Marker DNA (M1, M2; dengan ukuran dari bawah ke atas berturut-turut: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 dan 1500 bp).

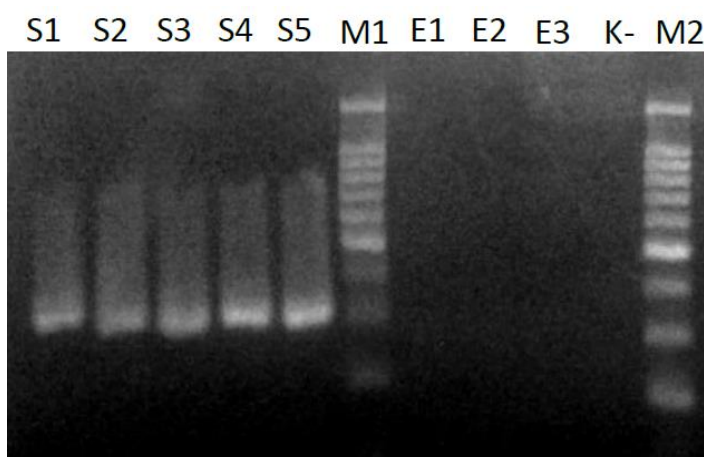
ST4	-----	20
CIXC01000001.1:291152-292411	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1211
CJDF01000001.1:380551-381810	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1211
CIZY01000001.1:174173-175432	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1211
ST2	-----	0
ST3	-----	20
CVLK01000002.1:217427-218947	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CJLM01000001.1:313460-314980	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CJXR01000001.1:313473-314993	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CGIR01000006.1:44082-45602	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CJXE01000007.1:44053-45573	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CEZK01000001.1:173970-175490	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
CIRH01000006.1:173970-175490	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGLR01000001.1:174067-175587	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGIN01000001.1:173970-175490	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGIQ01000006.1:173968-175488	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGIY01000001.1:173968-175488	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGJH01000001.1:173962-175482	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGJL01000001.1:173968-175488	AACCGAAGTCTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT	1472
NZ_CGJM01000001.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1200
ST2	-----CTCTCTTTACTGCGTTAA	18
ST3	-----	20
CVLK01000002.1:217427-218947	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CJLM01000001.1:313460-314980	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CJXR01000001.1:313473-314993	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CGIR01000006.1:44082-45602	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CJXE01000007.1:44053-45573	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CEZK01000001.1:173970-175490	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
CIRH01000006.1:173970-175490	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGLR01000001.1:174067-175587	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGIN01000001.1:173970-175490	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGIQ01000006.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGIY01000001.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGJH01000001.1:173962-175482	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGJL01000001.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGJM01000001.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGJN01000001.1:173968-175488	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521
NZ_CGTA01000001.1:173970-175490	GGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA	1521

(b)



Gambar 2. (a) Analisis penempelan primer dilakukan melalui analisis penjajaran urutan primer terhadap sekuen gen flagelin *Salmonella* galur Indonesia (diperoleh dari NCBI) menggunakan program *CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment*; (b) peta penempelan primer.

Dugaan ini diperkuat dengan hasil PCR tahap kedua, yaitu ketika produk PCR tersebut digunakan sebagai cetakan dengan menggunakan pasangan primer ST3 dan ST4, *S. typhi* menghasilkan produk PCR dengan bobot 300 bp (Gambar 3). Berdasarkan hasil uji spesifisitas primer-primer yang digunakan untuk deteksi *S. typhi* ini, pasangan primer ST1-ST2 dan ST3-ST4, tidak memberikan hasil ketika digunakan untuk jenis bakteri gram negatif yang lain yang sama-sama berada dipencernaan, yaitu *E. coli*. Selain itu, penempelan primer pada *S. typhi* spesifik di satu tempat yang ditunjukkan oleh dihasilkannya satu pita. Sehingga pasangan primer tersebut cukup spesifik untuk uji *S. typhi*.



Gambar 3. Elektroforegram tahap kedua dari *Salmonella thypi*. Dimana *S. typhi* sebagai kontrol positif (S1, S2, S3, S4, S5); *E. coli*, sebagai kontrol negatif (E1, E2, E3); Marker DNA (M1, M2; dengan ukuran dari bawah ke atas berturut-turut: 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 dan 1500 bp)

Uji Kontaminasi Salmonella pada Sampel



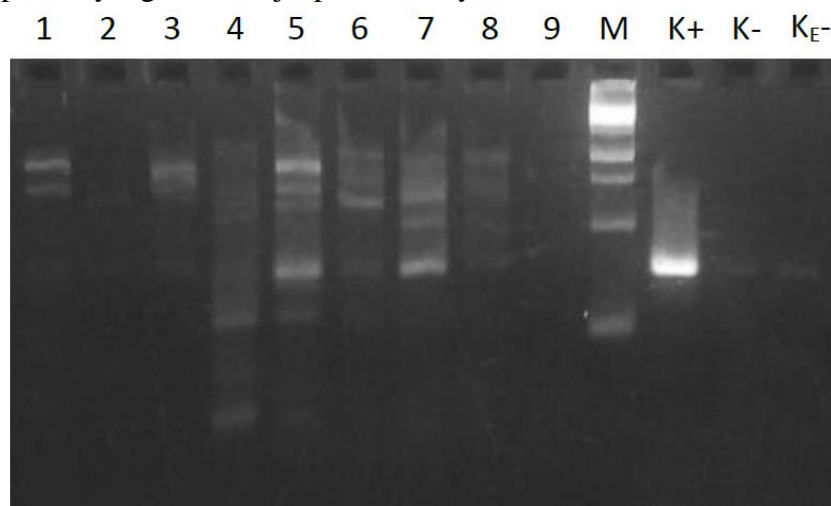
(a)



(b)

Gambar 4. Kultur bakteri yang terdapat pada sayuran. terdiri atas selada, kemangi, kol, timun, tomat, kacang panjang, terong bulat dan tauge (a) menggunakan media BPW dengan dikocok selama 24 jam (b).

Tahap pertama uji kontaminasi *S. typhi* adalah melakukan regenerasi bakteri yang terdapat pada sampel sayuran yang biasa dikonsumsi mentah, yaitu selada, kemangi, kol, timun, tomat, kacang panjang terong bulat dan tauge (Gambar 4 (a)), dilakukan kultur dalam media BPW sambil dikocok selama selama 24 jam (Gambar 4 (b)). Bakteri yang terdapat di supernatan, diisolasi menggunakan kit isolasi DNA. DNA hasil isolasinya digunakan sebagai cetakan PCR nested dengan primer yang telah diuji spesifisitasnya.



Gambar 5. Elektroforegram PCR tahap kedua *S. typhi* dari sampel sayuran. yaitu: timun (1), kacang panjang (2), terong bulat (3), tauge (4), tomat (5), tespong (6), kol (7), selada (6), kemangi (9); *S. typhi*, sebagai kontrol positif (K+); *E. coli*, sebagai kontrol negatif (K_E-); *nuclease free water*, sebagai blanko PCR (K-); Marker DNA (M dengan ukuran dari bawah ke atas berturut-turut: 250, 500, 750, 1000, 1500-10000 bp)

Hasil PCR pada sampel menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi *S.typhi* pada tomat dan kol. Terdapat pita non spesifik pada sampel. Hal ini kemungkinan disebabkan penempelan primer pada urutan gen yang mirip dengan gen flagellin yang ada pada mikroorganisme lain. Namun, spesifisitas primer terhadap *S.typhi* sudah baik, ditunjukkan oleh hanya satu pita saja yang terdapat pada *S.typhi* sebagai kontrol positif (Gambar 5). Selanjutnya pita non spesifik pada sampel dianalisis secara bioinformatika dengan mengecek penempelan primer di mikroorganisme lain selain *S. typhi* menggunakan nucleotide BLAST dengan terlebih dahulu masuk ke situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> lalu memasukkan urutan primer yang digunakan untuk melihat penempelannya pada mikroorganisme yang terdapat pada database. Nucleotide BLAST menunjukkan bahwa dari 100 organisme, 60 diantaranya adalah berbagai galur *Salmonella* dan sisanya, 40 organisme lain antara lain *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aspergillus*, dan lain sebagainya. Dari 40 organisme tersebut, tidak ada satupun yang merupakan bakteri gram negatif, sehingga analisis ini memperkuat bahwa primer yang dipakai untuk mendeteksi kontaminasi *S. typhi* ini sudah cukup spesifik.

4. PENUTUP

Kesimpulan

PCR *nested* dapat mendeteksi kontaminasi *S. typhi* pada sayuran. Dua jenis sayuran dari sembilan sayuran yang biasa dikonsumsi mentah yang digunakan sebagai sampel, yaitu tomat dan kol terbukti terkontaminasi *S. typhi*.

Saran

Untuk deteksi *Salmonella typhi* yang terdapat di Indonesia, perlu dirancang primer terhadap *S. typhi* galur khas Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya diberikan kepada Hibah Penelitian Dosen Pemula, RISTEKDIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed O. B., Asghar A. H., El-Rahim I. A. & AI H. (2014). Detection of *Salmonella* in Food Samples by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *J Bacteriol Parasitol*, 5(3): 1-3.
- Barakat S. M. Mahmoud. (2011). *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. *InTech*: Croatia
- Bharmoria A., Shukla A. and Sharma K. (2017). Typhoid Fever as a Challenge for Developing Countries and Elusive Diagnostic Approaches Available for the Enteric Fever. *Int J Vaccine Res*, 2(2), 1-16.

- Charles R. C., Sheikh A., Krastins B., Harris J. B., Bhuiyan M. S., LaRocque R. C., Logvinenko T., Sarracino D. A., Kudva I. T., Eisenstein J., Podolsky M. J., Kalsy A., Brooks W. A., Ludwig A., John M., Calderwood S. B., Qadri F., & Ryan E. T. (2010). Characterization of Anti-Salmonella enterica Serotype Typhi Antibody Responses in Bacteremic Bangladeshi Patients by an Immunoaffinity Proteomics-Based Technology. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(8) : 1188–1195.
- Chin C. F., Lai J. Y., Choong Y. S., Anthony A. A., Ismail A. & Lim T. S. (2016). Delineation of B-cell Epitopes of Salmonella enterica serovar Typhi Hemolysin E: Potential antibody therapeutic target. *Scientific Reports*, 7.
- Crump J. A., Luby S. P., Mintz E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Org*, 82 : 1-24.
- Goay Y. X., Chin K. L. dan Tan C. L. L., Yeoh C. Y., Ja'afar J. N., Zaidah A. R., Chinni S. V., and Phua K. K. (2016). Identification of Five Novel Salmonella Typhi-Specific Genes as Markers for Diagnosis of Typhoid Fever Using Single-Gene Target PCR Assays. *BioMed Research International*, 1-9.
- Hasan B., Nahar S. G., Shamsuzzaman A. K. M., Aftab S., Yusuf A. (2013). Detection of anti-salmonella antibodies by Immunochromatographic assay at Rajshahi Medical College, Bangladesh. *J. Microbiol. Antimicrob*, 5(11) : 119-123.
- Hatta, M., Sultan, A. R., Pastoor, R. & Smits, H. L. (2011). New Flagellin Gene for Salmonella enterica serovar Typhi from the East Indonesian Archipelago. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 84(3) : 429-434.
- Hayati A. S., Shah S. I. A., Shaikh N. (2011). Evaluation of Typhidot (IgM) in early and rapid diagnosis of typhoid fever. *Professional Med J*, 18(2) : 259-264.
- Krishna S., Desai S., Anjana V. K., Paranthaaman R. G. (2011). Typhidot (IgM) as a reliable and rapid diagnostic test for typhoid fever. *Ann. Trop. Med. Public Health*, 4(1): 42-44.
- Lee K. M., Runyon M., Herrman, T. J., Phillips R., Hsieh J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47 : 264-276.
- Ong, E. B. B., Anthony, A. A., Ismail, A. & Lim, T. S. (2013). Cloning, expression, and purification of the hemolysin/cytolysin (HlyE antigen) from Salmonella enterica serovar Typhi: potential application for immunoassay development. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 77 : 87–89.
- Song J. B., Cho H., Park M. Y., Na D. S., Moon H. B., & Pat C. H. (1993). Detection of Salmonella typhi in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6) : 1439-1443.
- Wallace, A. J. (2000). E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, 100, 265–276.