

DETEKSI *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DALAM PRODUK PANGAN SIAP SAJI MENGGUNAKAN METODE PCR, MELT CURVE, DAN ANALISIS HRM

Sitti Nurhamidah, M. Natsir Djide, Rudi Arfiansyah, Firzan Nainu

Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

Kata Kunci :

Salmonella enterica serovar Typhimurium, Pangan olahan, PCR, Melt Curve, HRM

ABSTRAK

Metode kultur konvensional membutuhkan waktu pengerjaan yang lama, dan sumber daya laboratorium yang besar. Olehnya itu, telah dikembangkan metode berbasis DNA dalam pengujian mikrobiologi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan metode yang tepat, dari berbagai metode berbasis DNA, dalam mendeteksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pada produk pangan siap saji. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah PCR, Melt Curve, dan Analisis HRM (*High Resolution Melting*). Dua gen yang digunakan sebagai target analisis molekuler dalam penelitian ini adalah *invA* dan *fliC*. Pengujian dilakukan terhadap tiga jenis sampel pangan siap saji, yaitu olahan daging, olahan unggas, dan salad buah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode PCR dan Melt Curve dapat mendeteksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium menggunakan primer yang mengamplifikasi sekuens spesifik pada gen *fliC*. Walaupun demikian, sensitivitas yang lebih baik ditunjukkan oleh metode real-time PCR dengan nilai LOD 0,5 pg. Lebih lanjut, metode analisis HRM terbukti mampu mendeteksi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan membedakannya dari serovar *Salmonella* yang lain, meskipun menggunakan primer *invA* yang kurang spesifik.

PENDAHULUAN

Kasus keracunan makanan telah banyak terjadi di dunia ini, bahkan di negara maju sekalipun. Di Amerika setiap tahun diperkirakan terjadi 48 juta kasus keracunan yang mengakibatkan sekitar 128.000 orang dirawat di rumah sakit dan sekitar 3000 orang meninggal dunia (1). Selama tahun 2015 Badan POM telah mencatat 61 kejadian luar biasa (KLB) keracunan pangan yang berasal dari 34 Propinsi. Dilaporkan jumlah orang yang terpapar sebanyak 8.263 orang, sedangkan kasus KLB keracunan pangan (*case*) yang dilaporkan sebanyak 2.251 orang sakit dan 3 orang meninggal dunia (2).

Berdasarkan data dari WHO tahun 2018, *Salmonella* merupakan penyebab tertinggi kasus keracunan makanan di seluruh dunia. *Salmonella* umumnya menginfeksi manusia melalui konsumsi makanan yang terkontaminasi terutama berasal dari daging, unggas, telur, dan susu (3). Infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella* merupakan masalah kesehatan yang sangat signifikan. Penelitian yang dilakukan oleh WHO terhadap keracunan pangan di dunia, menunjukkan bahwa non thypoidal serovars (NTS) telah memberikan pengaruh yang paling besar terhadap masalah kesehatan di Afrika, Asia Tenggara, dan Eropa Timur. Keracunan yang disebabkan oleh non thypoidal serovars, termasuk didalamnya adalah *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dan *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, diperkirakan terjadi sebanyak 93,8 juta diseluruh dunia dengan tingkat kematian diperkirakan terjadi pada 155.000 kasus (4).

Salah satu kendala pengujian mikrobiologi bakteri patogen pada makanan adalah komposisi makanan dan matriks yang kompleks (5). Metode kultur konvensional untuk mendeteksi *Salmonella* pada makanan, telah digunakan secara luas. Akan tetapi metode tersebut membutuhkan waktu pengerjaan yang cukup lama (3-5 hari) dan sumber daya laboratorium yang besar.

Pengujian PCR (Polymerase Chain Reaction) yang cepat dan akurat sangat tepat diterapkan dalam pengujian mikrobiologi (6). PCR telah mengalami perkembangan dengan adanya instrumen real-time PCR, yang dapat memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan PCR konvensional (5). Metode baru berbasis real-time PCR yang belum banyak digunakan dalam deteksi bakteri patogen adalah *high-resolution melting* (HRM) *analysis*. Salah satu penelitian yang menggunakan metode HRM dilakukan oleh Bratchikov dkk. (7) bertujuan untuk menentukan serotipe spesies *Salmonella*. Metode ini memberikan hasil yang cepat, dan mudah untuk diinterpretasi. Akan tetapi metode dalam penelitian tersebut belum diaplikasikan pada produk pangan. Olehnya itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Metode berbasis DNA diharapkan dapat memberikan hasil pengujian yang lebih cepat dan akurat dalam penanganan kasus keracunan.

Masuk 20-07-2018
Revisi 26-07-2018
Diterima 30-07-2018

Korespondensi

Firzan Nainu
firzannainu@unhas.ac.id

Sitti Nurhamidah
nurhamidahst@gmail.com

Copyright

© 2018 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
31-07-2018

Dapat Diakses Daring

Pada:
<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Sentrifuge (5430R, Eppendorf), real time PCR 7500 (Applied Biosystem), real time PCR Rotor Gene Q (Qiagen), Nanospektrofotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific), Elektroforesis gel agarosa (PowerPac™ Basic, Biorad), Dokumentasi gel (GelDoc™ XRT Imaging System, Biorad).

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel pangan siap saji dengan tiga matriks yang berbeda, bakteri uji target *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, bakteri uji non target *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Shigella sonnei* ATCC 9290, dan *Bacillus cereus* ATCC 6633. Media BPLS agar (Merck), Media BPW (Oxoid), Media PCA (Merck), Media BHIB (Merck), NaCl 0,9% (Otsuka), Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), GoTaq® Green Master Mix (Promega), Power up SYBR Green (Applied Biosystems), Agarose-Biotechnology Grade (1st Base), RT PCR Grade Water (Applied Biosystems), loading dye (Geneaid), 10x Tris Borate EDTA Buffer (1st Base), satu set primer *invA*, satu set primer *fliC*, dan Type It® HRM (Qiagen).

Prosedur Kerja

Isolasi DNA bakteri target dan non-target

Sejumlah 1 ml kultur yang berusia 24 jam dimasukkan dalam tabung sentrifus 1,5 mL dan didiamkan dalam air mendidih selama 20 menit. Selanjutnya tabung sentrifus segera dimasukkan ke dalam freezer selama 5 menit dan disentrifus pada 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus yang baru. Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi diukur menggunakan nanospektrofotometer dan digunakan sebagai cetakan DNA.

Penetapan konsentrasi primer oligonukleotida

Primer oligonukleotida yang digunakan dalam identifikasi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adalah *invA* dan *fliC* (tabel 3). Kedua jenis primer tersebut didesain oleh IDN® (Singapura). Primer dalam bentuk padatan disuspensi dengan NFW (*nuclease free water*) dalam jumlah tertentu sesuai petunjuk pada label primer untuk memperoleh konsentrasi 100µM.

Tabel 1. Primer oligonukleotida

Target	Sequence (5'-3')	Ukuran amplicon	Referensi
<i>invA</i>	Forward: ATCAGTACCAGTCGTCTTATCTTGAT	211	Shanmuga-sundaram, 2009 (8)
	Reverse: TCTGTTTACCAGGCATACCAT		
<i>fliC</i>	Forward: ATAGCCATCTTACCAGTCCCCC	183	Lim et.al, 2003 (9)
	Reverse: GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC		

Untuk eksperimen menggunakan instrumen PCR konvensional, primer *invA* digunakan pada konsentrasi 300 nM, merujuk pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (8). Sedangkan primer *fliC* digunakan pada konsentrasi 800 nM, merujuk pada Protokol Deteksi Bakteri Patogen yang dikeluarkan oleh Badan POM tahun 2014 (10). Kedua konsentrasi primer tersebut sesuai dengan nilai konsentrasi primer yang direkomendasikan pada protokol Go-Taq® Green Master Mix yaitu berada di rentang 100-1000 nM. Kontrol *running* dilakukan pada setiap konsentrasi.

Konsentrasi primer untuk Real-Time PCR ditentukan melalui optimasi berdasarkan protocol Power™ Up SYBR™ Green Master Mix yaitu 300-800 nM. Kontrol *running* dilakukan terhadap konsentrasi primer yang dipilih.

Uji spesifitas

Uji spesifitas dilakukan dengan menggunakan bakteri kontrol negatif meliputi uji inklusivitas terhadap *Salmonella* Enteritidis ATCC13076, dan uji eksklusivitas terhadap, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Shigella sonnei* ATCC 9290, dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Uji sensitifitas

Uji sensitifitas dilakukan terhadap konsentrasi DNA hasil isolasi dengan menggunakan pengenceran konsentrasi DNA 50 ng; 5 ng; 0,5 ng; 0,05 ng; 5 pg; 0,5 pg; 0,05 pg, 5 fg; 0,5 fg dan dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan metode PCR. Limit deteksi pada PCR konvensional ditetapkan berdasarkan nilai konsentrasi DNA terendah yang masih menghasilkan pita pada gel elektroforesis. Sedangkan pada real-time PCR, nilai limit deteksi ditentukan berdasarkan konsentrasi DNA terendah yang mengalami amplifikasi.

Penyiapan bakteri uji

Perhitungan jumlah mikroba target *Salmonella typhimurium* dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total dengan menggunakan media Plate Count Agar dan kondisi inkubasi 37°C selama 24 jam (11). Konsentrasi inokulum yang akan digunakan sebagai cemar adalah 10³ koloni/ml (12).

Satu ose bakteri uji ditumbuhkan pada media cair BHIB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu optimum. Bakteri umur 24 jam diencerkan dalam 9 mL larutan NaCl 0,9% hingga konsentrasi tertentu, dan dihitung jumlah bakteri pada media PCA dengan metode tuang. Tahap ini diulang sebanyak 3 kali, kemudian dihitung nilai rata-rata.

Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah sampel pangan siap saji. Sampel dipilih berdasarkan tingkat kemungkinan kontaminasi bakteri *Salmonella* yaitu daging olahan, daging unggas olahan, dan salad buah. Uji pendahuluan yang dilakukan yaitu: (a) Uji organoleptis. Pemeriksaan terhadap warna, bau dan rasa; (b) Uji kualitatif *S. Typhimurium*. Pengujian menggunakan metode kultur untuk mendeteksi adanya cemar *S. Typhimurium* dalam sampel.

Jika uji organoleptis memberikan hasil yang normal, dan uji kualitatif *S. Typhimurium* adalah negatif, maka sampel tersebut dipilih sebagai sampel uji dan dicemari bakteri *S. Typhimurium* sejumlah 10³ koloni/ml.

Penambahan cemar bakteri dalam sampel

Sampel ditimbang sejumlah 150 g dan ditambahkan 150 ml BPW, lalu dihomogenkan dengan Stomacher®. Cairan suspensi diambil dan disentrifus 1500 g untuk mengendapkan pengotor. Supernatan diambil sebanyak 5 ml dalam tabung steril. Sejumlah 5 ml bakteri uji dengan konsentrasi 10³ koloni/ml diinokulasikan ke dalam sampel. Sampel yang sudah diinokulasi, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu optimumnya sehingga memberi waktu pada bakteri untuk menempel pada matriks pangan. Tahap berikutnya pengenceran dilakukan dengan mengambil larutan sampel sebanyak masing-masing 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung yang sudah berisi 9 mL larutan pengencer BPW dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pada tahap akhir, 1 ml sampel diambil dan dilanjutkan ke prosedur isolasi DNA.

Isolasi DNA bakteri pada sampel pangan

Satu ml kultur yang berusia 24 jam disentrifus dengan kecepatan 13.000-16.000 x g selama 2 menit dan supernatan dibuang menyisakan pellet bakteri pada dasar tabung mikrosentrifus. Pellet tersebut selanjutnya diproses menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) sesuai dengan protokol yang disarankan. Secara ringkas, 600 µL *nuclei lysis solution* ditambahkan ke pellet bakteri dan diinkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit. Campuran didinginkan sampai suhu ruang lalu 3 µL *RNase solution* ditambahkan pada campuran, dihomogenkan, diinkubasi pada suhu 37°C selama 15-60 menit, dan didinginkan sampai suhu ruang. Selanjutnya, 200 µL *protein precipitation solution* ditambahkan ke dalam campuran kemudian divorteks. Campuran diinkubasi dalam es selama 5 menit kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 - 16.000 x g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tube yang berisi 600 µL isopropanol pada suhu ruang. Campuran disentrifus kemudian supernatan dibuang. Sebanyak 600 µL etanol 70% ditambahkan pada suhu ruang dan disentrifus dengan kecepatan 13.000-16.000 selama 2 menit. Etanol diuapkan dan pellet dikeringkan pada udara terbuka selama 10-15 menit. Pellet DNA direhidrasi dengan 100 µL *rehydration solution* selama 1 jam pada suhu 65°C. Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi diukur menggunakan nanospektrofotometer.

Deteksi *S. Typhimurium* menggunakan PCR konvensional

Sampel DNA terlebih dahulu dianalisis menggunakan metode PCR konvensional pada alat *thermal cycler* PCR 7500 (Applied Biosystem) berdasarkan protokol GoTaq® Green Master Mix (Promega). Konsentrasi primer *invA* dan primer *fliC* dalam tiap reaksi dengan total volume 25 µL adalah berturut-turut sebesar 300 nM (8) dan 800 nM (10). Tahapan reaksi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit kemudian dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi (*denaturation*) pada suhu 95°C selama 1 menit, penempelan (*annealing*) pada suhu 65°C selama 1 menit, dan pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 30 detik. Setelah itu dilanjutkan dengan pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 1 menit (9). Produk PCR kemudian diproses menggunakan 2% gel agarosa dan divisualisasikan menggunakan perangkat GelDoc™ XRT Imaging System.

Deteksi *S. Typhimurium* Menggunakan *real-time* PCR dan *melt curve analysis*

Sampel DNA selanjutnya dianalisis menggunakan alat Real Time PCR 7500 (Applied Biosystem) berdasarkan protokol Power up SYBR Green (Applied Biosystem). Konsentrasi primer *invA* dan primer *fliC* dalam tiap reaksi dengan total volume 20 µL adalah berturut-turut sebesar 300 nM dan 500 nM. Reaksi amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 10 menit kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari dua tahap yaitu denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik dan inkubasi pada suhu 60°C selama 1 menit untuk proses *annealing* dan *extension*. Setelah itu dilanjutkan dengan analisis kurva lebur (*melt curve analysis*) terhadap produk amplifikasi dengan peningkatan suhu sebesar 1°C secara bertahap dari 60°C sampai 95°C ($\pm 0,6^\circ\text{C}/20$ detik) (13).

Deteksi *S. Typhimurium* menggunakan *high resolution melting*

Untuk metode *high resolution melting* (HRM), sampel DNA diproses menggunakan alat Rotor Gene Q (Qiagen) berdasarkan protokol Type It® HRM (Qiagen). Secara ringkas, sampel DNA terlebih dahulu diamplifikasi

menggunakan primer *invA* (konsentrasi akhir 300 µM) dalam tiap reaksi dengan total volume 20 µL. Amplifikasi produk dilakukan dengan tahapan denaturasi awal 95°C selama 5 menit kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 10 detik, *annealing* pada 60°C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 10 detik. Pada tahap akhir kemudian dilakukan analisis suhu lebur resolusi tinggi (*high resolution melting analysis*, HRMA) terhadap produk amplifikasi dengan peningkatan suhu sebesar 0.1°C secara bertahap dari 50°C sampai 99°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}/2$ menit).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spesifisitas deteksi *S. Typhimurium* menggunakan PCR konvensional sangat bergantung pada gen target

Pada penelitian ini, kami melakukan uji eksklusifiti dan uji inklusifiti untuk menentukan spesifisitas sampel berdasarkan gen target yang digunakan. Uji eksklusifiti menggunakan lima jenis bakteri non-target yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Shigella sonnei* ATCC 9290, dan *Bacillus cereus* ATCC 6633. Sedangkan uji eksklusifiti menggunakan bakteri *Salmonella* dengan serotipe yang berbeda, yaitu *S. Enteritidis* ATCC 13076. Adapun gen target yang digunakan dalam penelitian ini adalah *invA* dan *fliC*.

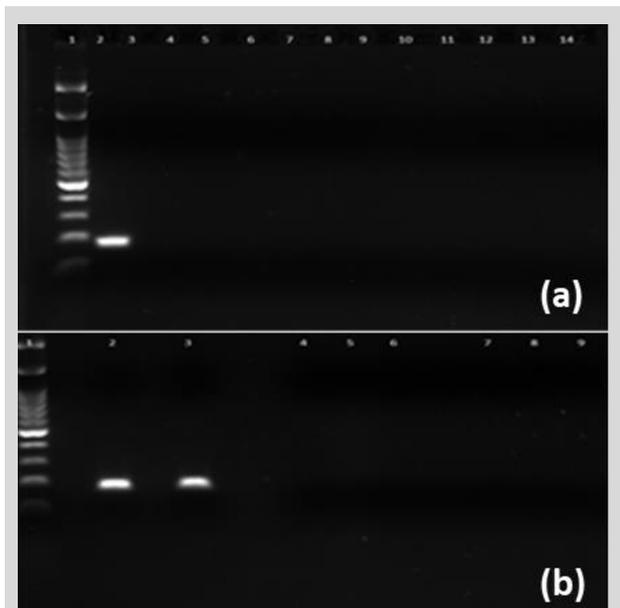
Uji spesifisitas primer *invA* menggunakan PCR konvensional memperlihatkan adanya amplifikasi pada bakteri *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis*, dan tidak memperlihatkan amplifikasi pada lima spesies bakteri non-target lainnya (**Gambar 1**), mengindikasikan bahwa sekuens target *invA* hanya dimiliki oleh strain *Salmonella* yang diuji dalam penelitian ini. Hal tersebut sejalan dengan hasil yang dilaporkan sebelumnya (8). Akan tetapi, pita DNA yang terdeteksi pada *S. Typhimurium* terletak sejajar dengan pita DNA yang terdeteksi pada *S. Enteritidis* (**Gambar 1**), menandakan bahwa pita DNA hasil amplifikasi dari kedua *Salmonella* tersebut memiliki panjang ampikon yang serupa sehingga metode PCR konvensional tidak dapat membedakan kedua *Salmonella* tersebut menggunakan sekuens target *invA*.



Gambar 1. Uji spesifisitas primer *invA* menggunakan PCR konvensional (Lajur 1. Marker DNA Ladder 100 bp; Lajur 2. Kontrol positif *Salmonella Typhimurium*; Lajur 3-5. *Staphylococcus aureus*; Lajur 6-8. *Escherichia coli*; Lajur 9-11. *Listeria monocytogenes*; Lajur 12-14. *Shigella sonnei*; Lajur 15-17. *Bacillus cereus*; Lajur 18-20. *Salmonella Enteritidis*)

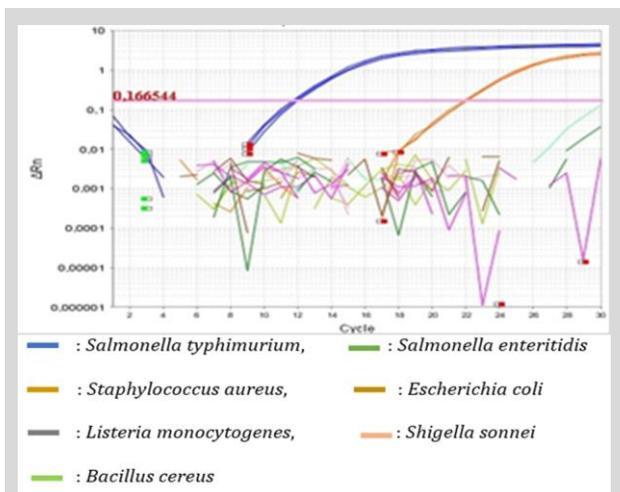
Berikutnya kami menguji spesifisitas primer *fliC*. Primer ini mengamplifikasi sekuens gen target *fliC* yang mengkode ekspresi flagellin pada bakteri. Seperti yang terlihat pada **Gambar 2**, amplifikasi hanya terjadi pada sampel DNA dari bakteri *S. Typhimurium*, dan tidak terjadi pada sampel DNA *S. Enteritidis* maupun bakteri-bakteri uji lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa *fliC* merupakan gen target yang bersifat lebih spesifik, jika dibandingkan dengan *invA*, untuk digunakan dalam mendeteksi keberadaan *S. Typhimurium*. Penelitian yang dilakukan oleh (14), memperlihatkan bahwa

selain terdeteksi pada *S. Typhimurium*, *fliC* juga terdeteksi pada *S. Aberdeen* dan *S. Landau*. Tetapi karena keterbatasan strain *Salmonella* yang terdapat di laboratorium, maka pengujian terhadap kedua strain *Salmonella* tersebut tidak dapat dilakukan.

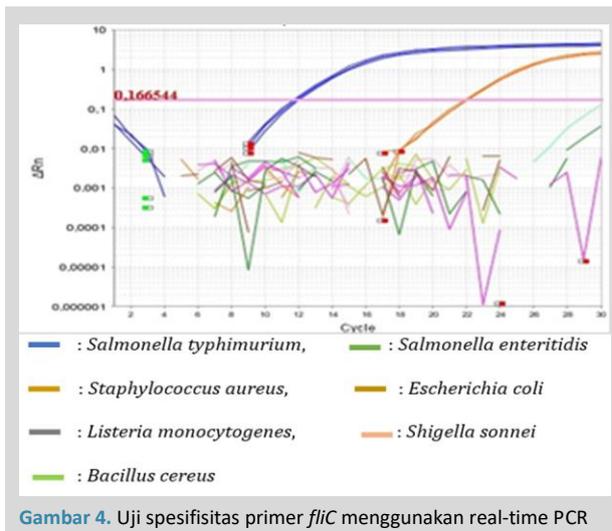


Gambar 2. (a) Uji spesifisitas primer *fliC* menggunakan PCR konvensional (Lajur 1. Marker DNA Ladder 100 bp; Lajur 2. Kontrol positif *Salmonella* Typhimurium; Lajur 3-5. *Salmonella* Enteritidis; Lajur 6-8. *Escherichia coli*; Lajur 9-11. *Listeria monocytogenes*; Lajur 12-14. *Staphylococcus aureus*). (b) Uji spesifisitas primer *fliC* menggunakan PCR konvensional (Lajur 1. Marker DNA Ladder 100 bp; Lajur 2-3 Kontrol positif *Salmonella* Typhimurium; Lajur 4-6. *Shigella sonnei*; Lajur 7-9. *Bacillus cereus*)

Uji spesifisitas primer *invA* menggunakan real-time PCR memberikan hasil yang serupa dengan yang diperoleh menggunakan teknik PCR konvensional. Hasil amplifikasi sekuens target menggunakan primer *invA* hanya terlihat pada sampel DNA *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis* namun tidak pada sampel DNA dari lima bakteri non-target yang digunakan (**Gambar 3**). Uji spesifisitas primer *fliC* menggunakan metode real-time PCR juga memberikan hasil yang sama dengan PCR konvensional, dimana amplifikasi hanya terjadi pada bakteri target *S. Typhimurium* (**Gambar 4**).



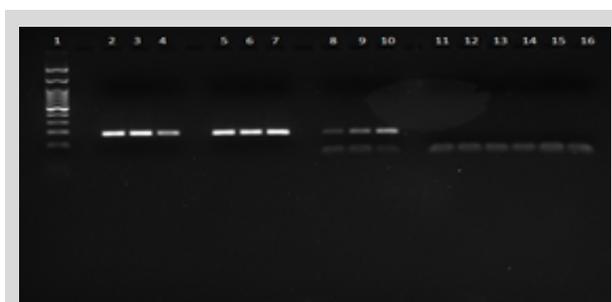
Gambar 3. Uji spesifisitas primer *invA* menggunakan real-time PCR



Gambar 4. Uji spesifisitas primer *fliC* menggunakan real-time PCR

Sensitivitas real-time PCR dalam deteksi *S. Typhimurium* menggunakan gen target *fliC*

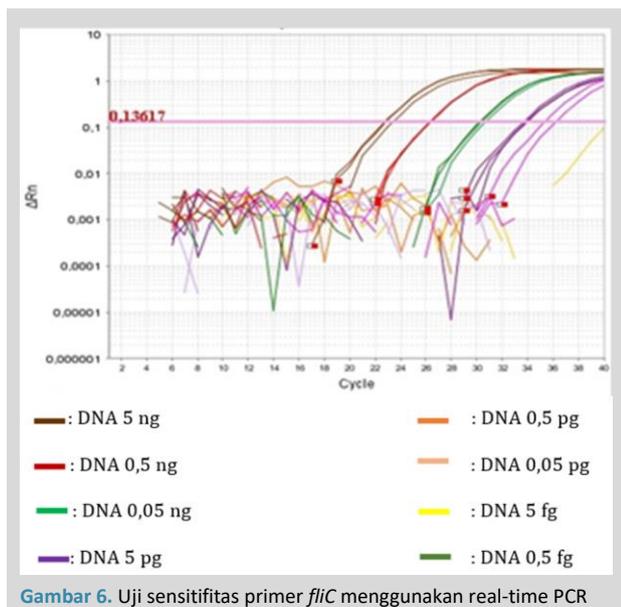
Uji sensitifitas dilakukan dengan menggunakan primer yang memberikan hasil yang spesifik yaitu *fliC*. Dengan menggunakan metode PCR konvensional DNA *S. Typhimurium* masih dapat dideteksi pada konsentrasi 0,5 ng (**Gambar 5**). Meskipun pita DNA juga terlihat pada konsentrasi dibawah 0,5 ng, akan tetapi posisinya tidak sejajar dengan pita DNA pada konsentrasi yang lebih tinggi. Kemungkinan pita tersebut adalah primer-dimer yang terjadi karena konsentrasi DNA yang sangat kecil. Nilai konsentrasi terendah yang masih bisa terdeteksi ditetapkan sebagai nilai LOD.



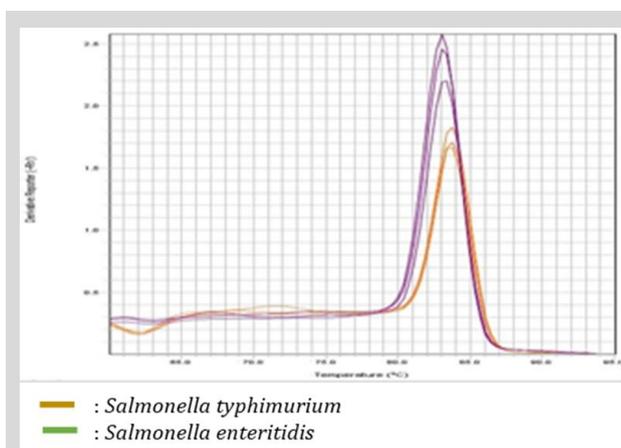
Gambar 5. Uji sensitifitas PCR konvensional (Lajur 1. Marker DNA Ladder 100 bp; Lajur 3-5. DNA konsentrasi 50 ng; Lajur 7-9. DNA konsentrasi 5 ng; Lajur 11-13. DNA konsentrasi 0,5 ng; Lajur 15-17. DNA konsentrasi 0,05 ng; Lajur 18-20. DNA konsentrasi 5 pg)

Uji sensitifitas juga dilakukan menggunakan real-time PCR 7500 (Applied Biosystem) menggunakan primer *fliC*. Nilai limit deteksi yang diperoleh jauh lebih kecil dari pada PCR konvensional, yaitu 0,5 pg (**Gambar 6**). Hal ini menunjukkan bahwa dalam penelitian ini instrumen real-time PCR memberikan hasil yang lebih sensitif dibanding PCR konvensional karena masih dapat mendeteksi keberadaan DNA *S. Typhimurium* meskipun dalam jumlah yang sangat kecil. Pada hasil uji spesifisitas primer *invA* terdapat dua kurva amplifikasi yaitu pada bakteri *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis*. Untuk membedakan keduanya maka dilakukan analisis *melt curve*. Dari hasil analisis *melt curve* diperoleh nilai *melting temperature* (T_m) yang sama antara keduanya. Nilai T_m *S. Typhimurium* adalah $\pm 83,72^\circ\text{C}$ dan *S. Enteritidis* adalah $\pm 83,14^\circ\text{C}$. Kurva yang dihasilkan pun sangat identic sehingga menyulitkan karakterisasi. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa dalam penelitian ini metode analisis *melt curve* tidak dapat digunakan untuk

membedakan *S. Typhimurium* dari *S. Enteritidis* jika menggunakan primer *invA* (Gambar 7).



Gambar 6. Uji sensitifitas primer *fliC* menggunakan real-time PCR

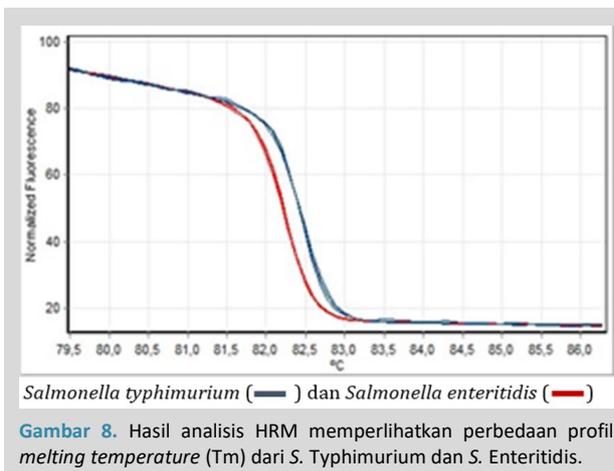


Gambar 7. Analisis kurva lebur (*melt curve*) amplicon primer *invA*

Selektifitas deteksi *S. Typhimurium* menggunakan teknik high resolution melting

Analisis kurva lebur (*melt curve*) merupakan metode yang cepat dan murah untuk memeriksa spesifisitas primer dan sekuens gen target. Sayangnya, analisis *melt curve* tidak dapat digunakan untuk membedakan *S. Typhimurium* dari *S. Enteritidis* dalam penelitian ini jika menggunakan primer *invA* (Gambar 7). Dengan demikian, dibutuhkan metode alternatif lain yang juga cepat dan murah. Metode genotyping *Salmonella* spp berbasis HRM (*high resolution melting*) adalah metode yang sangat cepat, tangguh, dan mudah diinterpretasi (7). Dalam penelitian ini metode analisis HRM digunakan pada instrumen Rotor Gene Q (Qiagen) dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan Rotor Gene Q series software ver.2.0.2 (Gambar 8).

Berdasarkan profil nilai T_m dan profil denaturasi yang diperoleh (Gambar 8), dapat disimpulkan bahwa metode HRM dapat digunakan untuk membedakan *S. Typhimurium* dari *S. Enteritidis* meskipun menggunakan primer *invA*. Profil denaturasi DNA dipengaruhi oleh komposisi basa sekuens DNA target yang berbeda pada setiap spesies. Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (7), dimana analisis HRM dapat membedakan serotipe *Salmonella* dengan menggunakan beberapa gen target.



Gambar 8. Hasil analisis HRM memperlihatkan perbedaan profil *melting temperature* (T_m) dari *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis*.

Deteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan siap saji

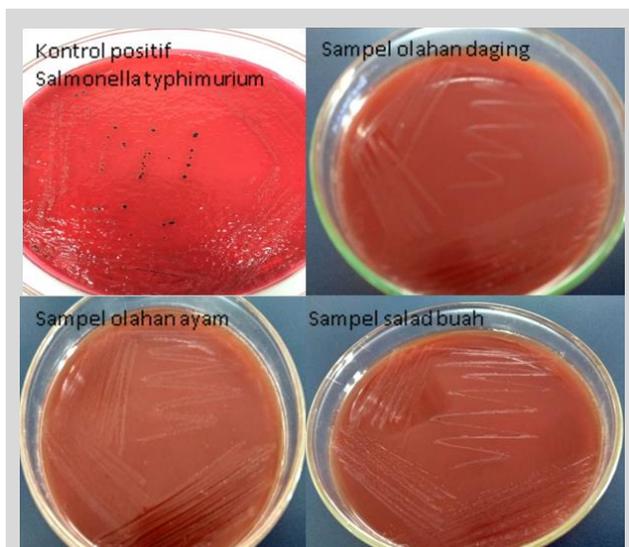
Selanjutnya, kami akan menggunakan metode yang telah kami kembangkan untuk mendeteksi keberadaan *S. Typhimurium* di dalam sejumlah produk pangan siap saji. Tiga jenis produk pangan siap saji yang diuji di dalam penelitian ini adalah produk olahan daging, produk olahan ayam, dan produk berupa salad buah.

Uji pendahuluan menunjukkan ketiga jenis pangan tersebut berada dalam kondisi normal. Hasil uji kualitatif memperlihatkan bahwa sampel tidak mengandung *Salmonella*. Ini dilihat dari koloni yang tumbuh pada sampel tidak sama dengan koloni spesifik *S. Typhimurium* pada media XLD (koloni translusen dengan bintik hitam di tengah) (Tabel 2 dan Gambar 9). Ketiga jenis pangan tersebut memenuhi syarat untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini. Tahap selanjutnya adalah menambahkan cemaran bakteri *S. Typhimurium* ke dalam masing-masing sampel dengan konsentrasi 10^3 koloni/ml.

Tabel 2. Hasil uji organoleptis

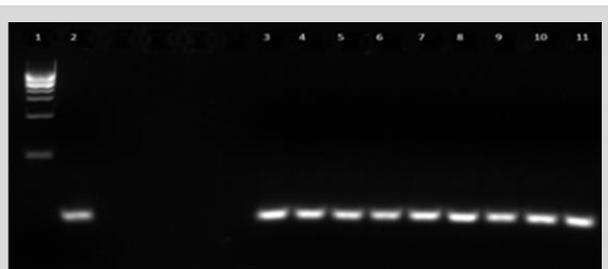
No.	Sampel	Parameter		
1	Olahan Daging	Campuran daging dalam kuah berwarna coklat kehitaman	Normal	Normal
2	Olahan Ayam	Campuran Ayam Sawir dan Sayuran	Normal	Normal
3	Salad Buah	Campuran Potongan Buah dan Cairan Mayonais	Normal	Normal

Proses selanjutnya adalah isolasi DNA dari sampel uji. Berbeda dengan prosedur isolasi DNA bakteri uji yang telah dilakukan sebelumnya, metode pendidihan tidak berhasil digunakan untuk mengisolasi DNA bakteri pada produk pangan. Isolat yang diperoleh dan digunakan sebagai cetakan (*template*) DNA dalam proses PCR tidak mengalami amplifikasi. Kemungkinan hal ini disebabkan karena produk pangan siap saji mengandung berbagai macam senyawa seperti lemak, protein, dan karbohidrat. Matriks yang kompleks tersebut dapat menghalangi proses isolasi DNA bakteri. Untuk mengatasi hal tersebut maka digunakan Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega). Kit ini telah dilengkapi dengan berbagai pereaksi dan menghasilkan isolat DNA dengan kemurnian yang lebih baik (data tidak ditampilkan)

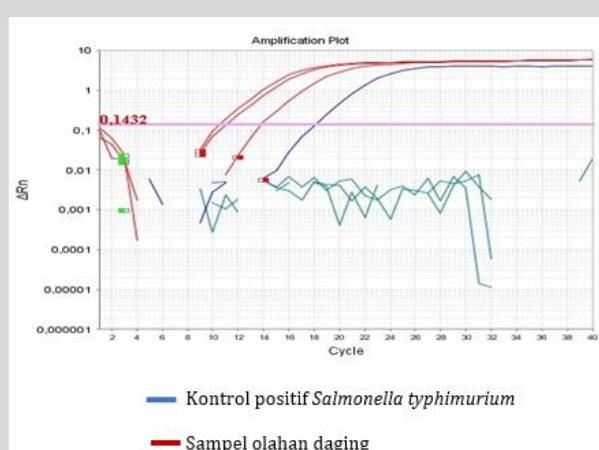


Gambar 9. Hasil uji kualitatif *S. Typhimurium* pada sampel produk pangan siap saji

Berdasarkan hasil uji spesifisitas yang telah dilakukan sebelumnya, terlihat bahwa primer *invA* tidak memberikan hasil yang spesifik terhadap *S. Typhimurium* menggunakan metode PCR konvensional. Oleh karena itu, primer *fliC* digunakan untuk mendeteksi *S. Typhimurium* dalam sampel produk pangan siap saji (**Gambar 10**). Primer *fliC* juga digunakan untuk mendeteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan siap saji menggunakan metode real-time PCR (**Gambar 11-Gambar 13**).



Gambar 10. Deteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan olahan menggunakan PCR konvensional (Lajur 1. Marker DNA Ladder 100 bp; Lajur 2. Kontrol positif *S. Typhimurium*; Lajur 3-5. Sampel olahan daging; Lajur 6-8. Sampel olahan ayam; Lajur 9-11. Sampel salad buah)

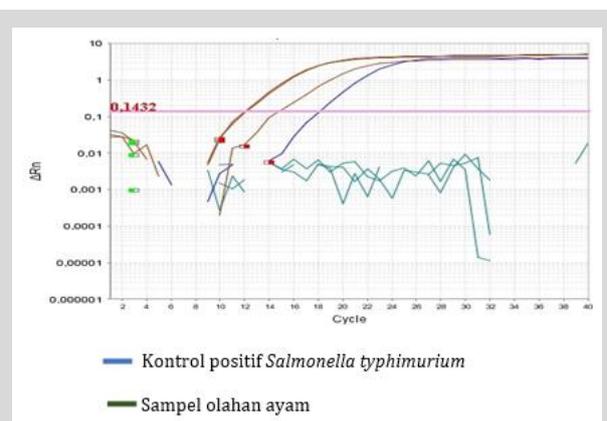


Gambar 11. Kurva amplifikasi hasil uji deteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan olahan daging menggunakan metode real-time PCR

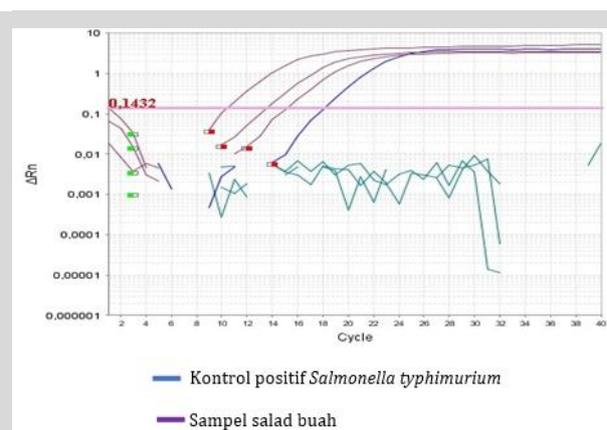
Dalam penelitian ini metode PCR konvensional dan real-time PCR dengan program analisis *melt curve* dapat digunakan untuk mendeteksi *S. Typhimurium* yang terdapat dalam sampel menggunakan primer *fliC*. Sampel pangan siap saji

yang digunakan yaitu olahan daging, olahan ayam, dan salad buah. Ketiga jenis sampel tersebut memiliki komposisi dan matriks yang kompleks. Pemilihan metode isolasi DNA dan primer yang digunakan merupakan faktor yang penting dalam proses ini.

Analisis *HRM* yang digunakan dalam penelitian ini juga memperlihatkan kinerja yang baik. Berdasarkan pengujian kultur murni menggunakan primer *invA*, metode HRM terbukti berhasil membedakan secara jelas antara *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis*, dimana hal ini tidak dapat dilakukan menggunakan hasil yang diperoleh dari PCR konvensional dan analisis *melt curve*.



Gambar 12. Kurva amplifikasi hasil uji deteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan olahan ayam menggunakan Real Time PCR



Gambar 13. Kurva amplifikasi hasil uji deteksi *S. Typhimurium* pada produk pangan salad buah menggunakan real-time PCR

KESIMPULAN

Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa metode deteksi *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* dalam produk pangan siap saji ditentukan oleh proses isolasi dan sekuens gen target yang digunakan. Metode PCR konvensional dan analisis *melt curve* hanya bisa mendeteksi *S. Typhimurium* dalam produk pangan siap saji jika menggunakan gen target spesifik spesies, *fliC*, sedangkan metode analisis HRM dapat mendeteksi *S. Typhimurium* dan membedakannya dari bakteri lain yang berbeda spesies maupun dalam satu spesies meskipun menggunakan get target *invA* yang kurang spesifik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan POM RI atas segala dukungan yang diberikan. Penulis juga berterima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas dukungan moral dan sarana selama penulis melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Scallan, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011. Vol. 17. 7.
2. Badan POM RI, 2016. Laporan Tahunan Badan POM tahun 2015, Badan POM
3. WHO, 2018. Salmonella. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases. Diunduh tanggal 12-01-2018
4. Dodd, C., Aldsworth, T., Stein, R. et al. 2017. *Foodborne Disease. Third Edition*. Academic Press. London. 3, 14-17.
5. Campos, G.L., Suarez J.V., Urda, M.A., Alonso, V.L. 2012. Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens. *Briefs in Food, Health, and Nutrition*. 13
6. Cheng, C.M., Doran, T., Lin, W. 2015. Interlaboratory Validation for a Real-Time PCR *Salmonella* Detection Method Using the ABI 7500 FAST Real-Time PCR System. *Journal of Food Protection*. Vol. 78. 1119-1124
7. Bratchikov, M., Mauricas, M. 2011. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. Genotyping HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71. 192-200.
8. Shanmugasundaram, M., Radhika, M., Murali, H.S., Batra, H.V. 2009. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fliB*, *iroB*, *invA*, *rfbJ*, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. *World J. Microbiol Biotechnol*. 1385-1394
9. Lim, Y.H., Hirose, K., Izumiya, H., Arakawa, E., Takahashi, H., Terajima J., Itoh, K.I., Tamura, K., Kim, S.I., Watanabe, H. 2003. Multiplex polymerase chain reaction for selective detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Japan Journal Infect. Dis*. Vol. 56. 151-155.
10. Badan POM RI, 2014. Protokol deteksi *E.coli* patogen, *S.typhimurium*, dan *V.cholerae* dengan menggunakan multiplex PCR untuk kajian mikrobiologi es dan minuman es. PROM Badan POM RI. 1-9
11. Badan POM RI, 2003. Buku Validasi Mikrobiologi. Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan POM RI, 9
12. FDA, 2015. *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds*. 2nd Edition. US Food & Drug Administration Office of Foods and Veterinary Medicine.
13. Barbau-Piednoir E, Botteldoorn, Yde M., Mahillon J., Roosens N.H. 2013. Development and validation of qualitative SYBR®Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(9):4021-4037
14. 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*. Vol. 47. 264-276.