

PELACAKAN *Salmonella enterica* serotype derby PADA RETAIL MARKET DENGAN METODE PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

Cynthia Devy Irawati

Bidang Pelayanan Sertifikasi dan Pengamanan Hasil Uji

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gungungsindur, Bogor – 16340

ABSTRAK

Salmonellosis merupakan salah satu penyakit yang paling umum dan terdistribusi secara luas yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella*. Langkah-langkah pengendalian dilakukan pada semua tahap rantai makanan. *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) dapat digunakan sebagai alat molekuler untuk *subtyping Salmonella*. Untuk mengetahui dan membandingkan pola genetik *Salmonella enterica* serotype derby pada retail market. Dua puluh dua isolat *Salmonella* dari daging babi diperoleh dari retail market. Isolat dari sampel daging dianalisa dengan PFGE. PFGE yang digunakan untuk *subtyping Salmonella spp.* menggunakan enzim *XbaI* dan *Bln I*. Hasilnya 22 isolat dari sampel daging babi yang dianalisa dengan PGFE memperlihatkan ada 4 PFGE *pattern* yang berbeda. Hasil PFGE *pattern* menunjukkan kebanyakan kejadian salmonellosis yang terjadi pada retail market kemungkinan berasal dari sumber yang sama karena 82% memiliki DNA *fingerprint* yang sama. PFGE dapat digunakan untuk membantu mengetahui sumber penyakit melalui DNA *fingerprint* sehingga dapat dilakukan eradikasi penyakit secara cepat dan tepat.

Kata kunci: *Salmonella*, *Salmonellosis*, PFGE, molekuler

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most common and widely distributed foodborne diseases and is caused by salmonella. Prevention requires control measures at all stages of the food chain. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) can be used as a molecular tool for subtyping Salmonella. This study determined and compared genetic patterns of Salmonella enterica serotype derby on the retail market. Twenty two isolates of Salmonella of pork derived from retail market. Isolates of pork samples were analyzed by PGFE. PFGE subtyping used for Salmonella spp. using enzymes XbaI and Bln I. Twenty two isolates from pork samples resulted 4 different PFGE pattern by using PFGE analysis. The result of PFGE patterns showed most salmonellosis occurred in the retail market was from the same source since 82% of the PFGE results had similar DNA fingerprint. PFGE can be used to determine the source of disease through DNA fingerprint so that the disease can be eradicated quickly and accurately.

Keywords: *Salmonella*, *Salmonellosis*, PFGE, molecular

PENDAHULUAN

Keamanan pangan dan kualitas daging telah menjadi keprihatinan utama bagi para praktisi dan produsen daging. *Salmonellosis* merupakan masalah besar bagi kesehatan masyarakat di seluruh dunia. *Salmonella spp* merupakan penyebab bakteri yang paling umum dari penyakit karena makanan. Hal ini disebabkan oleh konsumsi makanan yang terkontaminasi karena kegagalan untuk mengendalikan infeksi *Salmonella* di peternakan. Pada ternak babi, unggas bersama dengan telur, susu, dan makanan laut segar. *Salmonella* pada karkas, hasil dari kontaminasi tinja selama pemotongan dan pengolahan daging. Dalam hal ini, daging adalah sumber awal utama kontaminasi bakteri dan biasanya terletak di faring, kelenjar getah bening, perut, dan feses. Upaya sedang dilakukan untuk mengumpulkan informasi untuk mengurangi dan mengendalikan *Salmonella spp*. *Salmonella spp*. telah difokuskan pada pencegahan dan pengendalian penyakit pada ternak. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa serotipe *Salmonella* lingkungan terisolasi pada tahap pembibitan produksi memiliki korelasi yang lebih baik dengan serotipe terisolasi di rumah potong hewan daripada yang serotipe terisolasi pada tahap *finisher* produksi ⁽¹⁾

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) telah digunakan sebagai alat molekuler untuk *subtyping Salmonella*. PFGE adalah metode *subtyping* yang mendeteksi polimorfisme restriksi fragmen genom DNA (*macrorestriction*). Genom DNA dibatasi oleh enzim yang mengenali urutan DNA pendek dan memotong DNA setiap kali urutan terjadi. Dengan cara ini DNA genom dipotong menjadi sejumlah kecil (biasanya 10-20) dari fragmen restriksi dengan cara yang sangat spesifik dan direproduksi. Fragmen DNA ini biasanya terlalu besar untuk memisahkan dengan

elektroforesis gel agarosa konvensional. Dalam manfaat, mereka dapat secara efektif diselesaikan sesuai dengan ukuran mereka dengan proses disebut *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE). PFGE memfasilitasi migrasi diferensial fragmen DNA besar melalui gel agarosa dengan terus-menerus mengubah arah medan listrik selama elektroforesis. Medan listrik (CHEF) metode elektroforesis gel homogen kontur-dijepit telah menjadi metode pilihan untuk menyelesaikan fragmen DNA *macrorestriction* DNA genom bakteri ⁽³⁾.

PFGE merupakan metode universal yang dapat digunakan untuk *subtyping* bakteri dengan modifikasi tergantung pada spesies bakteri diselidiki. Biasanya, hanya pilihan enzim dan kondisi untuk pembatasan elektroforesis perlu dioptimalkan untuk masing-masing spesies. PGFE untuk *Escherichia coli* O157:H7, serotipe *Salmonella* non-tipoid, dan *Shigella sonnei* digunakan 2 enzim terbatas yang *XbaI* dan *Bln I*. *Xba I* memiliki urutan T / CTAGA dan menghasilkan fragmen dengan terminal 5'-kohesif. *Bln I* memiliki urutan C / CTAGG dan menghasilkan fragmen dengan terminal 5'-kohesif. Pola pembatasan DNA yang dihasilkan oleh PFGE stabil dan direproduksi pada tingkat intra dan inter-laboratorium ketika metode ini sangat standar. Karena relatif sederhana, diskriminatif tinggi dan reproduktifitas, PFGE telah menjadi *gold standart* untuk *subtyping* bakteri. Walaupun PFGE memiliki keterbatasan seperti memakan waktu, membutuhkan tingkat keterampilan yang tinggi, tidak bekerja untuk semua (yaitu pola klonal), fragmen DNA dipisahkan oleh ukuran mereka, bukan dengan urutan mereka, fragmen dengan ukuran yang sama dapat mewakili berbeda bagian dari genom, perbedaan yang diamati dalam pola PFGE mungkin sulit untuk menafsirkan dan beberapa strain tidak dapat terdeteksi oleh PFGE ⁽²⁾.

TUJUAN

Untuk mengetahui dan membandingkan pola genetik *Salmonella enterica serotype derby* pada *retail market* sehingga dapat membantu mengidentifikasi dan mengkonfirmasi sumber penyakit untuk kepentingan epidemiologi dalam rangka pemberantasan, penyelidikan dan pengawasan penyakit.

MATERI DAN METODE

MATERI

Dua puluh dua sampel isolat *Salmonella enterica serotype derby* yang berasal dari daging babi, diperoleh dari *retail market*. Materi yang digunakan adalah 1M Tris-HCL (pH 8.0), 0,5M EDTA (pH 8.0), TE Buffer, 0,5xTBE dengan mM Thiourea, 1 μ L *disposal loop* (NUC), Tube 14 mL tubes (2 tube tiap sampel), Proteinase K, Plug mold, DDW-steril, 1% *certified Megabase Agarose*, 1% sarcosine dan *single channel micropipette*.

METODE

Preparasi bakteri pada *agarose plug*

Isolat salmonella ditanam pada TSA inkubasi selama 24 jam. Kemudian ambil koloni bakteri menggunakan 1 μ L *disposal loop*. Larutkan dalam 200 μ L aquadest steril. Vortex dan campur hingga rata. Tambahkan 200 μ L 1% *certified megarose agarose*. Campur dan homogenkan hingga rata. Tuang agarose sample pada cetakan. Biarkan beku pada suhu ruang selama 10-15 menit atau 5 menit pada suhu 4°C.

Persiapan Proteinase K

Transfer agarose sampel dalam 1 mL 1% N-lauroysarcosine in 0.5 M EDTA, pH 8.0 (1% sarcosine) dengan 1 mg / mL *proteinase K solution* (50 μ L). Lalu inkubasi pada *water bath* 50°C selama 2 jam dengan kecepatan 30 rpm.

Persiapan untuk restriksi enzim

Buang proteinase K. Cuci dengan 1 ml TE. Lalu tuang 500 μ L 4 mM Pefabloc SC (AEBSF). Inkubasikan dalam *water bath* 50°C selama 20 menit. Ulangi pencucian sekali lagi. Rendam dalam 3 mL TE selama 20 menit pada suhu ruang.

Restriksi enzim untuk digesti *Xba I*

Buang TE buffer. Tambahkan 200 μ L 10xH Buffer. Inkubasi selama 20 menit pada 37°C. Buang buffer. Tambahkan 200 μ L enzim *XbaI*. Inkubasi selama 2 jam selama 37°C dengan kecepatan 30 rpm.

Restriksi enzim untuk digesti *BlnI*

Buang TE *buffer*. Tambahkan 200 μ L 10xH *buffer*. Inkubasi selama 20 menit pada 37°C. Buang buffer. Tambahkan 200 μ L enzim *BlnI*. Inkubasi selama 2 jam selama 37°C dengan kecepatan 30 rpm.

Pengaturan *plug*

Buang *enzyme buffer*. Tambahkan 400 μ L 0.5xTBE dalam 0,1 mM thiourea pada *plug*. Buat 1% *agarose gel* (*Pulse Field Gel Certified*) dalam 0.5x TBE dengan 0,1 mM thiourea. Set agar pada cetakan. Biarkan hingga beku.

Pengaturan *electrophoresis*

Siapkan 2 L of 0.5xTBE dalam 0,1 mM Thiourea dan simpan pada 4°C. Tambahkan 2 L DDW pada alat, nyalakan *pump* pada *chef DR II Drive module*. Tingkatkan kecepatan *pump* secara perlahan. Cuci selama 10 menit. Buang air lewat *exit flow*. Tambahkan 2 L 0.5xTBE dalam mM Thiourea dan nyalakan hingga terjadi gelembung. Nyalakan *Chef DR II Drive Module*. Nyalakan *cooling module* dan set pada suhu 14°C. Set kecepatan *pump* antara 70-80. Set gel

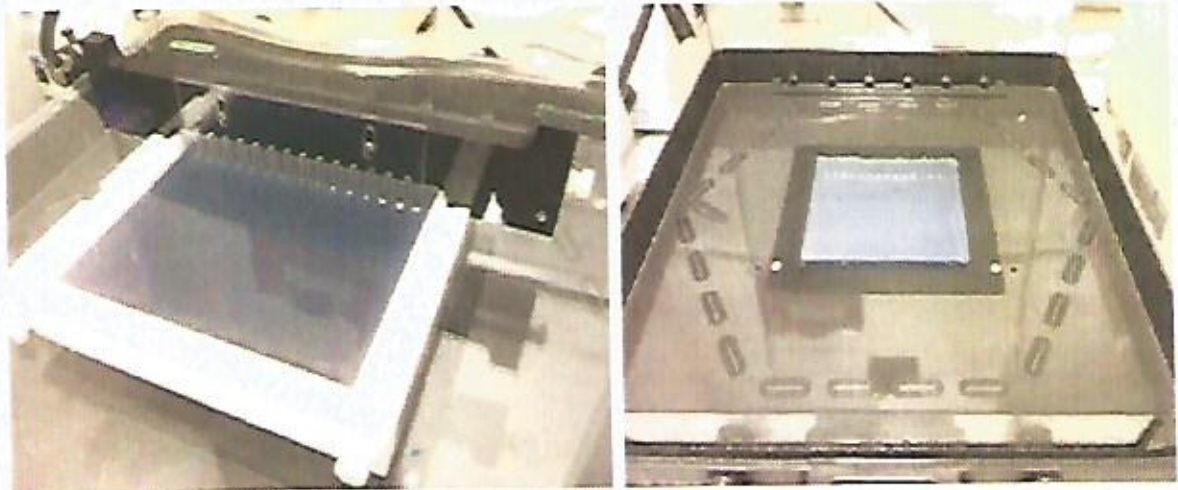
pada alat. Set *electrophoresis* pada 6.0 volt/cm, *initial time* 2.3, dan *final time* 54.2s, 21h. Setelah selesai diambil agar untuk diwarnai. Cuci *electrophoresis apparatus* dengan 2L aquadest selama 30 menit sebanyak 2 kali

Pewarnaan agar

Letakkan agar pada kontainer. Tambahkan 0.2-0.5 µg/ml Ethidium bromide. Warnai selama 30 menit. *De-staining* dalam aquadest selama 30 menit. *De-staining* selama 1-2 jam memberikan hasil yang lebih baik. Lalu cek band pada *transilluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *Salmonella enterica serotype derby* yang ditemukan pada *retail market* perlu dilakukan pelacakan sumber penyakit melalui metode PGFE. Setiap jenis bakteri memiliki DNA yang unik dengan membuat pola band yang disebut *fingerprint*. DNA *Fingerprint* yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang disebut *PFGE patterns*, seperti yang ditunjukkan pada Table 1.



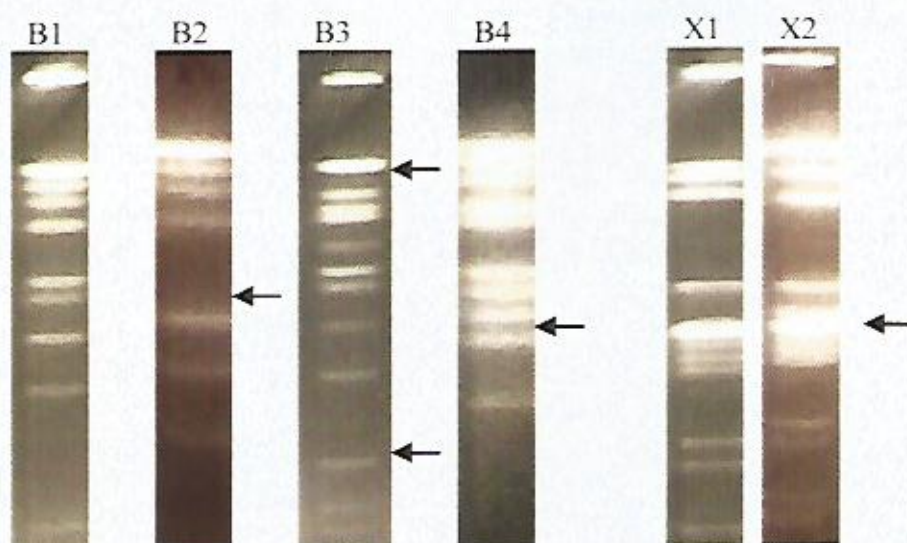
(A)

(B)

Gambar 1. A. Pengaturan plug pada agarose. B. Alat CHEF Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

No.	No. Sample	PFGE Pattern	
		<i>Xba I</i>	<i>Bln I</i>
1.	A	X1	B1
2.	B	X1	B1
3.	C	X1	B1
4.	D	X1	B1
5.	E	X1	B1
6.	F	X2	B2
7.	G	X1	B1
8.	H	X1	B3
9.	I	X1	B1
10.	J	X1	B1
11.	K	X1	B1
12.	L	X1	B4
13.	M	X1	B1
14.	N	X1	B1
15.	O	X1	B1
16.	P	X1	B1
17.	Q	X1	B1
18.	R	X1	B1
19.	S	X2	B2
20.	T	X1	B1
21.	U	X1	B1
22.	V	X1	B1

22 isolat dari sampel daging yang dianalisa dengan PGFE memperlihatkan ada 4 PFGE pattern yang berbeda. Sebagian besar isolat (18) memiliki pola yang sama pada *Xba I* dan *Bln I*, kecuali sampel F, H, L dan S. Sampel F dan S memiliki pola yang berbeda pada restriksi enzim *Xba I* dan *Bln I*. Sampel H dan L memiliki pola yang sama dari restriksi enzim *Xba I* namun pola yang berbeda pada *Bln I*. Gambar 1 menunjukkan berbagai jenis PFGE pattern *Bln I* dan *Xba I*. Empat PFGE pattern untuk *Bln I* dan dua PFGE pattern untuk *Xba I*.



Gambar 2. *Bln I* PFGE Pattern (B1-B4) dan *Xba I* PFGE Pattern (X1-X2)

Hasil *PFGE pattern* harus dibandingkan dengan *PFGE pattern* dari kasus *Salmonellosis* yang diisolasi dari peternakan, sumber lingkungan atau makanan. Hal ini dapat membantu mengidentifikasi sumber infeksi dalam rangka pemberantasan *Salmonellosis*. Data diatas menunjukkan kebanyakan kejadian *Salmonellosis* yang terjadi pada *retail market* kemungkinan berasal dari sumber yang sama karena 82% memiliki DNA *fingerprint* yang sama ⁽⁴⁾.

Kontrol pakan asal hewan memainkan peranan yang sangat penting dalam menjamin pakan yang berkualitas tinggi, aman dan bergizi untuk pasokan pangan bagi masyarakat. Dalam rangka mewujudkan kesehatan yang baik, peningkatan ekonomi dari perdagangan yang aman dan bermutu tinggi. Keberadaan *Salmonellosis* bisa menjadi perhatian bagi kesehatan masyarakat Veteriner untuk menyelidiki dan mengendalikan kesehatan hewan untuk persediaan makanan yang merupakan elemen penting dalam kesehatan manusia ⁽¹⁾.

KESIMPULAN

1. 22 isolat dari sampel daging yang dianalisa dengan PGFE memperlihatkan 4 PFGE *pattern* yang berbeda
2. Hasil PFGE *pattern* menunjukkan kebanyakan kejadian salmonellosis yang terjadi pada retail market kemungkinan berasal dari sumber yang sama karena 82% memiliki DNA *fingerprint* yang sama.
3. PFGE dapat digunakan untuk membantu mengetahui sumber penyakit melalui DNA *fingerprint* sehingga dapat dilakukan eradikasi penyakit secara cepat dan tepat.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Murase T, Nakamura A, Matsushima A. & Yamai S.** 1996. An epidemiological study of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak. Pubmed
2. **Anonimus.** 2016. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE). Center for Diseases Control and Prevention. PulseNet. PulseNet Methods
3. **Nassanova ES.** 2008. Cell and Tissue Biology. Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application
4. **Kerouanton A, Weill F-X, Granier SA, Chemaly M. & Denis M.** 2009. Comparison of PFGE and antibioresistance profiles of *Salmonella enterica serotype derby* isolated from pig and humansalmonellosis in France.