

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *Salmonella sp.* PADA AYAM PETELUR DI INDONESIA DENGAN TEKNIK KULTUR DAN SEROTYPING MENGGUNAKAN PCR

Irma Rahayuningtyas, Ernes Andesfha, Istiyaningsih, Lilis Sri Astuti, Neneng Atikah

Unit Uji Bakteriologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Bogor 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri *Salmonella sp.* dari sampel feses ayam petelur dari beberapa peternakan di 15 Propinsi di Indonesia dengan teknik kultur dan *serotyping* menggunakan PCR. Pengambilan sampel dilakukan secara acak sistematis sebanyak 310 sampel feses ayam. Isolasi dan identifikasi dilakukan dengan metode kultur isolasi *Salmonella sp.* sesuai dengan SNI 2987:2008 dan dilanjutkan identifikasi serotipe dengan teknik PCR. Isolasi dari 310 sampel feses ayam petelur diperoleh hasil positif *Salmonella sp.* sebanyak 27 isolat selanjutnya dilakukan konfirmasi untuk penentuan serotype menggunakan teknik PCR dan *sequencing*. Hasil PCR didapatkan 22 isolat positif *Salmonella enteritidis*, dan hasil *sequencing* terhadap 5 isolat yang tidak terdeteksi serotype diuji *sequencing* dan hasilnya 3 isolat positif *Salmonella anatum*, dan 2 isolat positif *Salmonella moscow*. Hasil isolasi menggunakan teknik kultur dan dikonfirmasi menggunakan teknik PCR dan *sequencing* didapatkan hasil yang linear, sehingga dapat disimpulkan kedua metode tersebut dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi serotype *Salmonella sp.*

Kata kunci: feses, ayam petelur, *Salmonella sp.*, *serotyping*, PCR, *sequencing*

ABSTRACT

The isolation and identification of *Salmonella sp.* from the sample of laying hens from several farms in 15 provinces in Indonesia have been carried out using culture and *serotyping* technique by PCR. A total of 310 samples of laying hens feces were taken from several farms in Indonesia and sampling were conducted randomly systematic. Samples were identified by the isolation culture method of *Salmonella sp.* in accordance with SNI 2987:2008 and continued to identify of serotypes by PCR technique. Isolation of 310 samples of laying hens resulted 27 isolates were positive to *Salmonella sp.* then confirmed for serotype determination using PCR and *sequencing* techniques. The PCR confirmed 22 isolates were positif to *Salmonella enteritidis*, and for 5 isolates that were not serotype detected then were tested using *sequencing* test resulted 3 positive isolates of *Salmonella anatum*, and 2 positive isolates of *Salmonella moscow*. The results of isolation using culture technique and confirmed using PCR technique and *sequencing* obtained linear results, so it can be concluded that both methods can be used for isolation and identification of *Salmonella sp.* serotypes.

Keywords: feces, laying hens, *Salmonella sp.*, *serotyping*, PCR, *sequencing*

PENDAHULUAN

Infeksi dan kontaminasi yang disebabkan oleh *Salmonella sp.* ditemukan hampir di seluruh dunia. Pada tahun 1991, di Belanda banyak didapatkan kontaminasi *Salmonella spp.* pada daging ayam dan telur. Pada tahun 1994, dari 87% ternak kalkun di Kanada, ditemukan banyak yang positif *Salmonella spp.* ⁽²¹⁾. Kejadian *Salmonella* di Indonesia, khususnya di Malang diketahui bahwa 3 dari 36 sampel hasil penelitian sampel karkas ayam broiler segar terdeteksi positif *Salmonella spp.* ⁽²⁴⁾.

Salmonella adalah bakteri Gram negatif yang tidak berspora, berbentuk batang kecil dan tumbuh dengan optimum pada suhu 35 °C sampai 37 °C. *Salmonella* diklasifikasikan dalam dua spesies yaitu *Salmonella enterica* dan *Salmonella bongori* ⁽¹⁸⁾. Unggas dapat diinfeksi oleh berbagai jenis dari *Salmonella enterica*, beberapa jenisnya seperti *S. pullorum* dan *S. gallinarum* merupakan bakteri spesifik yang dibawa oleh ayam, adapun jenis lainnya seperti *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, dan *S. heidelberg* dapat menginfeksi lebih banyak inang seperti unggas, babi, sapi, dan telur serta produk-produk segar lainnya ⁽¹⁶⁾.

Salmonellosis adalah penyakit menular pada hewan yang bersifat zoonosis dan termasuk *food borne disease* ⁽¹⁴⁾. Telur dan produknya adalah makanan perantara yang paling sering menjadi media penyebaran *Salmonella* pada manusia. Kasus *Salmonellosis* pada manusia yang disebabkan oleh bakteri patogen *Salmonella enteritidis* pada umumnya bersumber dari telur konsumsi yang dimakan mentah atau dimasak tidak sempurna. Pada kasus *Salmonellosis*, ditemukan sebesar 62,5% disebabkan oleh *Salmonella enteritidis*, 12,9% oleh *Salmonella thypimurium* dan kurang dari 2% disebabkan oleh *Salmonella* serotipe yang lain ⁽¹²⁾.

Penyebaran organisme *parathypoid* atau *Samonella* sering terjadi melalui kotoran yang telah terkontaminasi dan mencemari pakan, air minum, dan kerabang telur tetas. Ayam petelur dewasa yang terinfeksi *Salmonella sp.* dapat membawa bakteri ini dalam usus besar dan terkumpul pada feses ⁽²⁵⁾. *Salmonella spp.* dapat mencemari ayam sejak dari peternakan, dimana titik awal dari rantai penyediaan pangan asal ternak adalah kandang atau peternakan. Manajemen atau tata laksana peternakan akan menentukan kualitas produk ternak yang dihasilkan sehingga biosekuriti di peternakan harus terlaksana dengan baik agar cemaran mikroba dapat diminimalkan ⁽¹⁰⁾.

Pencegahan masuknya infeksi *Salmonella spp.* sangat penting dilakukan untuk menjaga kesehatan unggas dan industri makanan ⁽⁵⁾. Hewan yang terinfeksi di peternakan harus secepatnya diidentifikasi dan diisolasi dari yang lain untuk mencegah dan mengendalikan penyebaran infeksi. Oleh karena itu kontrol dalam mengurangi kontaminasi *Salmonella spp.* pada unggas dimulai dari peternakan ^(11, 30). Metode konvensional untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Salmonella spp.* adalah metode *selective enrichment* dan *plating* serta diikuti dengan uji biokimia ⁽⁷⁾. Beberapa teknik dapat digunakan untuk mendeteksi serovar *Salmonella spp.*, seperti menggunakan *selective culture medium*, tetapi identifikasi dengan metode tersebut membutuhkan waktu yang lama terutama jika sampel yang diuji banyak.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik *in vitro* yang digunakan untuk melakukan replikasi atau amplifikasi bagian spesifik dari berjuta lipatan DNA hanya dalam beberapa jam ⁽²⁰⁾. Keunggulan dari teknik PCR diantaranya dapat memperbanyak DNA pada bagian yang spesifik sesuai yang diharapkan ⁽²⁶⁾, memiliki sensitivitas tinggi, dapat digunakan untuk melakukan pengujian hingga manipulasi DNA ⁽²⁰⁾, mampu memberikan hasil dalam waktu singkat, dapat digunakan untuk mendeteksi sampel yang terkontaminasi maupun menyeleksi sampel negative ⁽³⁾, dapat mengidentifikasi organisme secara mendetail hingga tingkat spesies bahkan serotipe yang bahkan tidak dapat dilakukan menggunakan sistem konvensional ⁽¹⁹⁾, dapat bekerja pada materi genetik dari berbagai sel, serta dapat dilakukan pada sampel yang berupa campuran kompleks. PCR juga memiliki beberapa kelemahan, diantaranya DNA sel bakteri yang mati ikut terdeteksi pula ⁽²⁾. Beberapa metode uji telah dibandingkan, kombinasi PCR dan media kultur standar adalah metode yang paling efektif dengan akurasi tinggi untuk mendeteksi *Salmonella* pathogen pada produk peternakan dan daging ⁽²²⁾.

Kajian ini selain untuk memperoleh isolat *Salmonella* dari feses ayam layer di beberapa peternakan di Indonesia dalam rangka pemetaan *Anti-Microbia Resistance* yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, juga sebagai upaya pengembangan teknik dan metoda dalam pengujian isolasi *Salmonella.sp* dengan metoda SNI 2987:2008 dan metoda baru dengan menggunakan media kromogenik(*Rapid Salmonella*, BioRad), serta penentuan serotipe *Salmonella* dengan teknik PCR. Hasil kajian ini diharapkan dapat menambah referensi dalam pemilihan metode yang akan digunakan dalam pengujian isolasi dan penentuan serotipe *Salmonella*.

MATERI DAN METODE

MATERI

Bahan

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini adalah feses ayam layer dalam masa produksi. Media dan pereaksi yang digunakan untuk kultur isolasi *Salmonella* dalam pengujian ini adalah *Lactose Broth* (LB), *Tetrathionate Broth* (TTB), *Rappaport-Vassiliadis* (RV), *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) Agar, *Bismuth Sulfite* (BSA) Agar, *Nutrient Agar* (NA), *Stock Culture Agar* (SCA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indole Motility* (SIM) Agar, *Methyl Red-Voges Proskauer* (MRVP)broth, *Simmons citrat Agar*, Reagen Kovac,*Lysine Decarboxylase Broth*, dan *Rapid Salmonella Agar* (BioRad). Adapun bahan yang digunakan untuk konfirmasi PCR, *serotyping*, dan *sequencing* yaitu primer spesifik untuk *Salmonella sp*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, dan Primer 16s;HotStarTaq[®] Master Mix Kit (QIAGEN, CAT : 203443),QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Cat#51304), ethanol absolute, DNA ladder 100 bp, Buffer TAE 1x, Agarose 2.5%, loading dye, SYBR Safe, ExoSAP-IT[™] PCRProduct Cleanup Reagent (AB, CAT#78200.200.UL), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit * (AB, Cat.#4337455), dan BigDye X-Terminator Kit (AB, Cat#4376487), Anode Buffer Container (ABC), Cathoda Buffer Container (ABC), dan Polymer POP7.

Peralatan

Alat-alat utama yang digunakan dalam kultur isolasi *Salmonella* ini adalah timbangan, kertas timbang, pinset, stomacher, tabung reaksi, vortex mixer, ose, cawan petri, autoklaf, aluminium foil, pipet atau pippetor 1 mL, 2 mL, 5 mL dan 10 mL, botol media, pH meter, magnetic stirrer, inkubator 35⁰C dan 42⁰C, waterbath, dan clean bench. Sedangkan untuk PCR dan sequencing alat-alat yang digunakan adalah Bench Hood, Vortex, Mikrospin, Mikrosentrifuse, Mesin thermocycler, Tube 200 µL, Ice plate, Classic Mikro pipet (1000 µL, 100 µL, 10 µL), Bio Clean Aerosol Resistant Barrier Tips (1000 µL, 100 µL, 10 µL), Disposable Free Powder Gloves, Gelas Erlenmeyer, Qiaamp Spin Columns, Collection tubes, Timbangan digital, Microwave, Cetakan agarose dan comb, Mesin Elektroforesis (Mupid 2), Botol duran 1000 mL, Gelas ukur, Safe imager, Plate sampel 96 well, Septa plate 96 well, Sampel retainer, Kapiler 50 cm 8 kapiler, dan Mesin GeneticAnalyzer 3500.

METODE

Prosedur Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel feses dari peternak dilakukan secara acak sistematis. Data dan lokasi pengambilan sampel diperoleh dari Dinas Peternakan dari masing-masing Provinsi dan ditentukan dua Kabupaten yang akan dituju. Sampel feses diambil dari ayam petelur dalam masa produksi sebanyak 10 sampel feses untuk setiap kabupaten. Feses diambil dari ayam yang baru mengeluarkan feses dengan spatula kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril dan dibawa ke laboratorium dengan menggunakan *cooler box*.

Isolasi *Salmonella sp.*

Isolasi *Salmonella sp.* dari sampel feses ayam petelur diambil dari 15 provinsi di Indonesia dilakukan di Laboratorium Unit Uji Bakteriologi BBPMSOH pada bulan Februari 2016 hingga Juli 2016. Prosedur isolasi yang digunakan berdasarkan SNI 2987:2008 tentang metode pengujian cemaran mikroba pada produk daging, telur, dan susu serta hasil olahannya. Isolat yang didapatkan selanjutnya akan dilakukan uji kepekaan mikrobial di Unit Uji Farmasetik BBPMSOH.

Tahap Pra-Pengkayaan

Prosedur pra-pengkayaan isolasi *Salmonella sp* sebagai berikut: sampel feses sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml media LB steril dan dihomogenkan dengan vortex mixer untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.

Tahap Pengkayaan

Sebanyak 1 ml sampel yang telah diinkubasi di dalam media LB diambil dan diinokulasi ke dalam 10 ml media TTB. Media TTB yang sudah diinokulasi diinkubasi pada suhu 35 °C dalam inkubator selama 24 jam ± 2 jam; inokulasikan juga sebanyak 0.1 ml sampel yang telah diinkubasi di dalam media LB ke dalam 10 ml media RV; media RV yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 42 °C dalam inkubator selama 24 jam ± 2 jam.

Tahap Agar Selektif

Sampel yang telah diinkubasi pada masing-masing media pengkayaan diambil satu ose dan digoreskan secara kuadran pada media selektif. Media selektif untuk isolasi *Salmonella sp* yaitu XLD Agar, BSA, dan RSA. Media XLD, BSA, RSA kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam. Setelah inkubasi diamati apakah ada koloni tipikal yang tumbuh pada masing-masing agar.

Apabila terdapat koloni tipikal yang tumbuh, maka dilakukan purifikasi. Purifikasi dilakukan menggunakan media selektif tersebut. Hasil biakan yang sudah dipurifikasi lalu ditumbuhkan di media umum NA untuk selanjutnya dilakukan konfirmasi dengan uji biokimia.

Uji Biokimia

Selanjutnya analisa dilanjutkan dengan uji biokimia dengan menggunakan media TSI Agar, SIM Agar, MRVP broth, *Lysine Decarboxylase Broth*, dan *Simmons citrat Agar*. Koloni yang tumbuh pada media NA masing-masing diinokulasikan menggunakan jarum ose steril pada TSI Agar, SIM Agar, MRVP broth, *Lysine Decarboxylase Broth* dan *Simmons citrate Agar* lalu diinkubasi dalam inkubator 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.

PCR Identifikasi dan Serotyping *Salmonella*

a. Ekstraksi DNA

Isolat *Salmonella sp* yang didapatkan dari kultur diremajakan dengan menginokulasikan 1 ose isolat ke dalam media *Heart Infusion Broth* (HIB) dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam. Selanjutnya transfer 1 ose isolat *Salmonella sp* dari media HIB ke dalam media HIA dan inkubasikan pada suhu 35 °C selama 24 jam ± 2 jam. Ambil 4 – 5 ose isolat *Salmonella sp* dari media HIA untuk diekstraksi menggunakan *QiaAmp DNA Mini Kit* (QIAGEN, CAT : 51304).

b. Master Mix

Untuk konfirmasi Genus *Salmonella* menggunakan sepasang primer spesifik gen *ompC* *Salmonella* genus Reference Juan Alvarez et 2004, forward *ompC* ATCGCTGACTTATGCAATCG dan reverse *ompC* CGGGTTGCGTTATAGGTCTG dengan panjang amplikon 204 bp. Untuk Serotyping serovar Enteritidis menggunakan sepasang primer spesifik gen ENT *Salmonella* serotype Enteritidis Reference Juan Alvarez et 2004, forward ENTf TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG dan reverse ENTf TGA ACTACGTTTCGTTCTTCTGG dengan panjang amplikon 304 bp. Untuk Serotyping serovar Gallinarum-Pullorum menggunakan sepasang primer spesifik gen Sgal *Salmonella* serotype Gallinarum-Pullorum Reference Borys Stegny et 2014, forward Sgal CCGCACAACACATCAGAAAG dan reverse Sgal AGCTGCCAGAGGTTACGCTG dengan panjang amplikon 97 bp. Reagen Master Mix PCR menggunakan HotStarTaq®

Master Mix Kit (QIAGEN, CAT : 203443) 12.5 µL, Primer F dan R (sesuai serotype) masing - masing (20µM) 1 µL, RT PCR Grade Water 5.5 µL, DNA hasil ekstraksi 5 µL.

c. Amplifikasi

1) *Salmonella sp* dan *Salmonella* serotype Enteritidis

- Hot Start 95°C 15 menit, Denaturasi 30 cycle : 94 °C 1 menit, *Annealing* 57.5 °C (Serotype enteritidis) dan 58.5°C (*Salmonella sp*) masing – masing 1 menit, Elongasi 72°C 1 menit, dan *Final Elongasi* 72°C 10 menit.

2) *Salmonella* serotype Gallinarum-Pullorum

- Hot Start 94°C 2 menit, Denaturasi 30 cycle : 94 °C 45 detik, *Annealing* 62 °C (Serotype Gallinarum-Pullorum) 45 detik, Elongasi 72°C 1 menit, dan *Final Elongasi* 72°C 10 menit.

d. Elektroforesis DNA

Menggunakan mesin Mupid 2, 100 volt selama 40 menit DNA *ladder* 100 bp, Buffer TAE 1x, *Agarose* 2.5%, *loading dye*, dan *SYBR Safe*. Pembacaan hasil elektroforesis menggunakan mesin *self imager*. Hasil positif *Salmonella sp* ditunjukkan dengan munculnya pita dengan panjang ampikon 204 bp, *Salmonella* serotype enteritidis 304 bp, dan *Salmonella* serotype pullorum 97 bp.

e. DNA Sequencing

Jika didapatkan hasil negatif dengan ketiga primer tersebut maka dilanjutkan identifikasi menggunakan *Sequencing* dengan target full gen 16S dan analisis BLAST.

Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan menampilkan hasil isolasi, identifikasi, dan *serotyping* bakteri *Salmonella*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pengkajian ini dapat dideteksi adanya *Salmonella sp.* sebanyak 8.71 % dari keseluruhan sampel feses yang diambil. Hasil identifikasi terhadap 310 sampel ayam petelur ditemukan bakteri *Salmonella sp* sebanyak 27 isolat dari feses (Tabel 1).

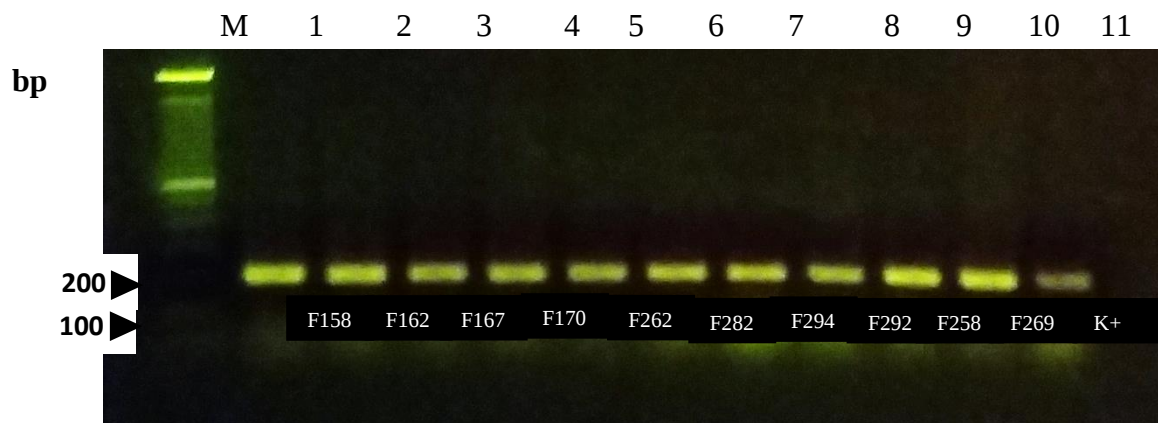
Tabel 1. Isolasi *Salmonella sp* berdasarkan kultur dan uji biokimia

Jumlah Sampel	Media Kultur	Kultur pada Media Selektif		Uji Biokimia		Total Positif Sampel	Deteksi (%)
		Positif Salmonella	Negatif Salmonella	Positif Salmonella	Negatif Salmonella		
310 feses	LB TTB RV XLD BSA	27	283	27	283	27	8.71

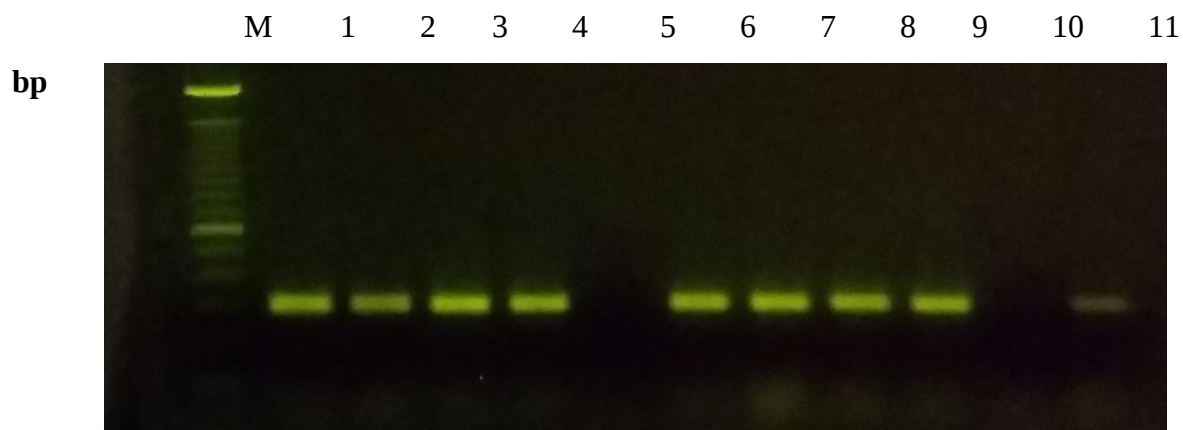
Prosedur isolasi yang digunakan berdasarkan SNI 2987:2008 yang meliputi tahap pra-pengkayaan, pengkayaan, agar selektif, purifikasi, uji biokimia, dan penyimpanan stok. Setiap tahapan isolasi dilakukan secara berurutan. Sampel yang menunjukkan reaksi positif diduga *Salmonella spp* pada media yang telah diinokulasi pada setiap tahapan akan dilanjutkan ke tahapan selanjutnya, sedangkan pada sampel yang mempunyai reaksi negatif akan dihentikan proses isolasinya. Dalam setiap pengujian selalu disertai dengan kontrol positif berupa media yang telah diinokulasi kuman *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 dan kontrol negatif berupa media yang tidak diinokulasi.

Koloni tipikal *Salmonella sp* pada media XLD yaitu koloni terlihat merah muda dengan atau tanpa titik mengkilat atau terlihat hampir seluruh koloni hitam (H₂S). Pada media BSA koloni terlihat keabu-abuan atau kehitaman, kadang metalik, media di sekitar koloni berwarna coklat (SNI 2897:2008). Dalam pengkajian ini digunakan media kromogenik RSA. Media ini merupakan media spesifik untuk *Salmonella* dimana koloni *Salmoella sp* akan terlihat berwarna ungu, sedangkan koloni *Enterobacter* lain akan berwarna selain ungu. *Salmonella* dalam TSI Agar menunjukkan perubahan warna menjadi hitam searah dengan tusukan pada isolat *Salmonella sp*. Reaksi spesifik *Salmonella sp* pada TSI agar miring adalah pada bagian permukaan miring (*slant*) berwarna merah/alkaline (reaksi basa) dan memproduksi H₂S yang ditunjukkan warna kehitaman pada dasar Agar (*butt*) kadang hingga menutupi warna kuning (reaksi asam) Agar dasar. Reaksi spesifik *Salmonella sp* pada SIM yaitu negatif indol (tidak terbentuk cincin merah), VP negatif (tidak terjadi perubahan warna pada media setelah ditetesi dengan pereaksi *Alphanaphtol* dan KOH), MR dan Citrate bisa positif atau negatif, sedangkan *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB) harus negatif (berwarna ungu). Pada pewarnaan Gram *Salmonella sp* berbentuk batang dan berwarna merah (Gram negatif).

Setelah didapatkan 27 isolat *Salmonella sp* dengan kultur, isolat - isolat tersebut dikonfirmasi kembali dengan metode PCR. Konfirmasi Genus *Salmonella* menggunakan sepasang primer spesifik gen *ompC* (Alvarez, 2004)⁽¹⁾. Gen *ompC* adalah gen yang mengkode biosintesis *outer membrane protein C* dari Genus *Salmonella*. Gen *ompC* dipilih untuk deteksi spesies *Salmonella* karena mempunyai spesifisitas yang tinggi dibandingkan dengan test yang lain sehingga lebih cepat didapatkan isolat *Salmonella spp* daripada dengan metode kultur konvensional dan uji biokimia, Mini API 20 E dan tes serologi (Jawad, A.A. and Al-Charrakh, A. H., 2016)⁽¹⁷⁾. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya pita (band) pada 204 bp. Dari ke 27 isolat tersebut semua positif *Salmonella sp.*, hal ini membuktikan bahwa hasil identifikasi *Salmonella* secara PCR dan kultur mempunyai hasil yang linear. Selanjutnya isolat tersebut dilakukan serotyping menggunakan primer spesifik ENT untuk mengetahui apakah isolat tersebut merupakan *Salmonella enteritidis*. (Alvarez, 2004)⁽¹⁾. Dari ke 27 isolat *Salmonella* yang diuji dengan primer *S. enteritidis*, 22 isolat menunjukkan hasil positif terbentuk pita di panjang 304 bp. Sebanyak 5 isolat *Salmonella sp* yang belum diketahui *serotype* nya diuji kembali dengan PCR menggunakan primer spesifik *sgal* untuk identifikasi *S. gallinarum* atau *S. pullorum*. Didapatkan hasil dari kelima isolat *Salmonella sp* tersebut negatif *S. gallinarum* / *S. pullorum*. Selanjutnya kelima isolat tersebut dilakukan *sequencing* untuk mengetahui *serotype*.



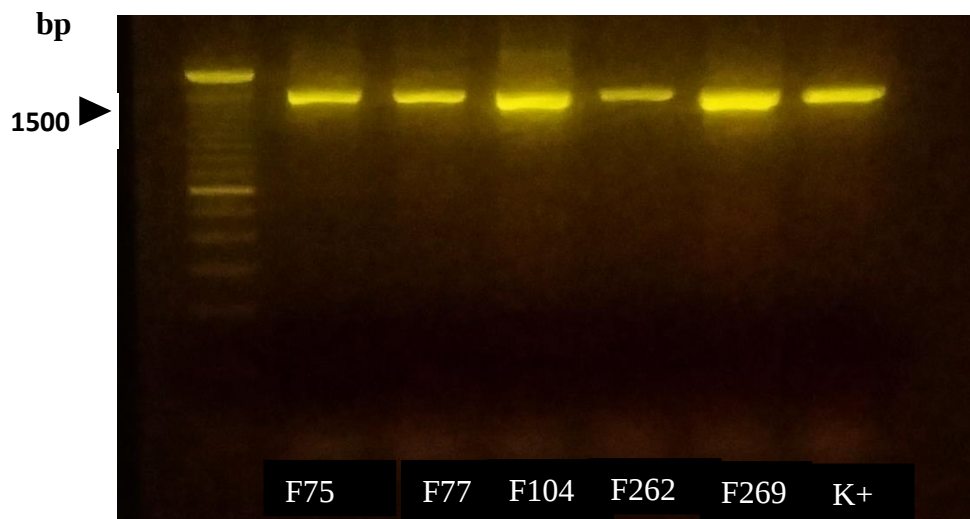
Gambar 1. Hasil elektroforesis identifikasi *Salmonella sp*.





Gambar 2. Hasil elektroforesis identifikasi *Salmonella enteritidis*

Sequencing dilakukan dengan menggunakan 6 primer gen 16S rRNA. Primer tersebut merupakan primer untuk identifikasi bakteri secara umum. Hasil positif ditunjukkan dengan pita dengan panjang amplikon 1542 bp. 16S rRNA adalah suatu jenis RNA yang dilibatkan dalam produksi protein yang paling sering digunakan sebagai penanda molekuler. Sekuens gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi bakteri yang mengalami penyimpangan strain fenotip. Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem (Cai, H., 2003)⁽⁴⁾.



Gambar 3. Hasil elektroforesis identifikasi *Salmonella* dengan Primer 16s

Dari hasil analisis BLAST terhadap kelima isolat tersebut didapatkan bahwa 3 isolat mempunyai kemiripan genetik dengan *Salmonella enterica* serovar *Anatum* dan 2 isolat mempunyai kemiripan genetik dengan *Salmonella enterica* serovar *Moscow*. *Salmonella enterica* subs. *Enterica* serovar *Anatum* adalah salah satu serovar *Salmonella* yang menyebabkan penyakit karena mencemari pangan (*food borne*). *Salmonella Anatum*, bersama dengan

enterotoxigenic E. coli menjadi penyebab kejadian keracunan setelah mengonsumsi pasta salad tercemar pada tahun 2006 di Denmark (Pakalniskiene, J., et al, 2009)⁽²³⁾. Tidak banyak kasus Salmonellosis yang diakibatkan *Salmonella Moscow*, tetapi dilaporkan pada Oktober 1955 di daerah Ontario menimbulkan kematian pada 22 ekor bebek dari 700 ekor umur 13 hari. Tingkat kematian tidak banyak akan tetapi kematian terjadi secara mendadak. Berdasarkan hasil nekropsi di laboratorium diketahui bahwa hati berwarna tembaga, lesi pada hati keabuan dan focal necrosis, dan *airsacc plaque*. Setelah dilakukan kultur dari organ hati, jantung, dan limpa didapatkan isolat *Salmonella moscow* (Truscott, R.B., 1956)⁽²⁹⁾.

Tabel 2. Identifikasi dan Serotyping Salmonella dengan PCR

	Target Gen OMPC	Hasil Uji PCR		Hasil Sequencing
		Target Gen ENT	Target Gen Sgal	Target gen Full Gen 16s
Kode Sampel	<i>Salmonella Enterica</i> sp.	<i>Salmonella Enterica</i> serotype <i>enteritidis</i>	<i>Salmonella Enterica</i> serotype <i>Gallinarum-Pullorum</i>	
F29	positif	positif	negatif	
F60	positif	positif	negatif	
F75	positif	negatif	negatif	<i>Salmonella Enterica</i> serotype <i>Anatum</i>
F77	positif	negatif	negatif	<i>Salmonella Enterica</i> serotype <i>Anatum</i>
F100	positif	positif	negatif	
F101	positif	positif	negatif	
F104	positif	negatif	negatif	<i>Salmonella Enterica</i> serotype <i>Anatum</i>
F105	positif	positif	negatif	
F107	positif	positif	negatif	
F108	positif	positif	negatif	
F115	positif	positif	negatif	
F117	positif	positif	negatif	
F118	positif	positif	negatif	
F155	positif	positif	negatif	
F158	positif	positif	negatif	
F162	positif	positif	negatif	
F167	positif	positif	negatif	
F170	positif	positif	negatif	
F196	positif	positif	negatif	
F200	positif	positif	negatif	
F255	positif	positif	negatif	

F258	positif	positif	negatif	<i>Salmonella Enterica</i> <i>serotype Moscow</i>
F262	positif	negatif	negatif	
F269	positif	negatif	negatif	<i>Salmonella Enterica</i> <i>serotype Moscow</i>
F282	positif	positif	negatif	
F292	positif	positif	negatif	
F294	positif	positif	negatif	

Dari ke 27 isolat yang didapatkan dengan teknik kultur semua positif *Salmonella sp.*, ketika dikonfirmasi dengan PCR. Hal ini membuktikan bahwa hasil identifikasi *Salmonella* secara PCR dan kultur mempunyai hasil yang linear. Ada beberapa kelebihan penggunaan PCR sebagai metode identifikasi dan *serotyping* *Salmonella*, yaitu dapat memperbanyak DNA pada bagian yang spesifik sesuai yang diharapkan ⁽²⁶⁾, memiliki sensitivitas tinggi, dapat digunakan untuk melakukan pengujian hingga manipulasi DNA ⁽²⁰⁾, mampu memberikan hasil dalam waktu singkat, dapat digunakan untuk mendeteksi sampel yang terkontaminasi maupun menyeleksi sampel negatif ⁽³⁾, dapat mengidentifikasi organisme secara mendetail hingga tingkat spesies bahkan serotipe yang bahkan tidak dapat dilakukan menggunakan sistem konvensional ⁽¹⁹⁾, dapat bekerja pada materi genetik dari berbagai sel, serta dapat dilakukan pada sampel yang berupa campuran kompleks, tetapi PCR juga memiliki beberapa kelemahan, diantaranya DNA sel bakteri yang mati ikut terdeteksi pula ⁽²⁾. Dari beberapa metode uji, kombinasi PCR dan media kultur standar adalah metode yang paling efektif dengan akurasi tinggi untuk mendeteksi *Salmonella* patogen pada produk peternakan dan daging ⁽²²⁾.

KESIMPULAN

Dari ke 27 isolat yang didapatkan dengan teknik kultur semua positif *Salmonella sp.* ketika dikonfirmasi dengan PCR. Hal ini membuktikan bahwa hasil identifikasi *Salmonella sp.* secara PCR dan kultur mempunyai hasil yang linear, sehingga dapat disimpulkan kedua metode tersebut dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi serotype *Salmonella sp.*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A. B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and

Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2004, p. 1734–1738.

2. **Agrawal, S.** 2008. *Techniques in Molecular Biology*. International Book Distributing Co., Lucknow.
3. **Bell, C. and A. Kyriakides.** 2002. *Salmonella : A Practical Approach to The Organism and Its Control In Foods*. Blackwell Science, Ltd., Oxford.
4. **Cai, H., Archambault, M., and Prescott, J. F.** 2003. 16S Ribosomal RNA Sequence-Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria. *J.Vet Diagn. Invest.* 2003 Sep;15(5):465-9.
5. **Carli, K. T., C. B. Unal, V. Caner, and A. Eyigor.** 2001. Detection of *Salmonella* in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1871-1876.
6. **Chao, M. R., C. H. Hsien, C. M. Yeh, S. J. Chou, C. Chu, Y. C. Su, & C. Y. Yu.** 2007. Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries by using hatched eggshell membranes. *J. Pol Sci.* 86:1651-1655.
7. **Chiu, C. H., and T. O. Jonathan.** 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC* by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* 67: 2619-2622.
8. **Dho-Moulin, M. & Fairbrother, J.M.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30 , 299-316.
9. **Barnes, H.J. & Gross, W.B.** 1997. Colibacillosis. In : B.W. Calnek, (Ed.), *Diseases of Poultry* 10th ed (pp. 131-141). Ames: Iowa State University Press.
10. **Ferreira, A. J. P., C. S. A. Ferreira, T. Knobl, A. M. Moreno, M. R. Bacarro, M. Chen, M. Robach, and G. C. Mead.** 2003. *Comparison of Three Commercial Competitive-Exclusion Products for Controlling Salmonella Colonization of Broilers in Brazil*. *J. Food Prot.* 66: 409-492.
11. **Ferretti, R., L. Mannazzu, L. Cocolin, G. Comi, and F. Clementi.** 2001. *Twelve-hours PCR-based method for detection of Salmonella spp.* In *food. Appl. Environ. Microbiol.* 74: 977-978.

12. **Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humprey, & F. V. Immerseel.** 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. Fed. Eur. Mic. Soc. 33:718-738.
13. **García C, Soriano JM, Benítez V, Catalá-Gregori P.** 2010. Assessment of *Salmonella* spp. in feces, cloacal swabs, and eggs (eggshell and content separately) from a laying hen farm. Poult Sci. 2011 Jul;90(7):1581-5. doi: 10.3382/ps.2010-01104. PubMed PMID: 21673175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673175>.
14. **Gast, R. K, R. Guraya, J. G. Bouldin, P. S. Holt, & R. W. Moore.** 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hen infected with *Salmonella enteritidis* or *Salmonella heidelberg*. J. Avi. Dis. 41:40-44.
15. **Harry, E.G. & Hemsley, L.A.** 1965. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia. *The Veterinary Record*, 77, 35-40.
16. **Hong, Y. T. L., C. Hofacre, M. Maier, D. G. White, S. Ayers, L. Wang, & J. J. Maurer.** 2003. A restriction fragment length polymorphism-based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying *Salmonella* serotypes. J. Avi. Dis. 47:387-398
17. **Jawad, A.A. and Al-Charrakh, A. H.** 2016. Outer Membrane Protein C (ompC) Gene as the Target for Diagnosis of *Salmonella* Species Isolated from Human and Animal Sources. Avicenna J Med Biotechnol. 2016. Jan-Mar; 8(1): 42-45.
18. **Jordan F, Pattison M, Alexander D, Faragher T.** 2001. Poultry Diseases. London (GB): WB Saunders.
19. **Kohlerschmidt, D.J., K.A. Musser, and N.B. Dumas.** 2009. Identification of Aerobic Gram-Negative Bacteria'. Dalam Goldman, E. and L.H. Green (ed.). Practical Handbook of Microbiology, Second Edition. CRC Press, Boca Raton.
20. **Loeffelholz, M. and H. Deng.** 2006. PCR and Its Variations'. Dalam Tang, Y.W. and C.W. Stratton (ed.). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer Science+Business Media LLC., New York.
21. **Myint, M. S.** 2004. Epidemiology of *Salmonella* Contamination of Poultry meat Products: Knowledge GAPS in the Farm to Store Product. Dissertation submitted to the Faculty of the

Graduate School of the University of Maryland, College Park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

22. **Nikbakht, B. and Sani, A.M.** 2016. Identification of *Salmonella* spp. from Contaminated Meat Samples By Multiplex PCR-Based Assay. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences ISSN No. 2320 – 8694 August - 2016; Volume – 4(5).
23. **Pakalniskiene, J., Falkenhorst, G, Lisby, M., Madsen, S. B., Olsen, K.E.P., Nielsen, E.M., Mygh, A., Boel, J., MØlbak, K.** 2009. A Foodborne Outbreak of Enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella* Anatum Infection after A High-School Dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiol Infect* 137:396-401.
24. **Primajati, Satwika Esa.** 2011. Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella* spp dan *Listeria Monocytogenes* pada Karkas Ayam Broiler Segar yang Beredar di Kota Malang. (abstrak) Universitas Brawijaya Malang.
25. **Saeed, A. M., D. Thiagarajan, & E. Asem.** 1999. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in laying hens. In A. M. Saeed (Ed). *Salmonella enterica* Seroovar *Enteritidis* in Human and Animals, 1th ed. Iowa State University Press, Iowa USA.
26. **Sanderson, K. and D. Nichols.** 2003 'Genetic Techniques : PCR, NASBA, Hybridisation and Microarrays'. Dalam McMeekin, T.A. (ed.). *Detecting Pathogens in Food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge and CRC Press LLC., Boca Raton.
27. **Stegniy, B., Gerylovich, A., Arefyev, V., Glebova, K., and Potkonjak, A.** 2014. A Method for Detecting and Typing of *Salmonella* by Multiplex PCR. *Arhiv veterinarske medicine*, Vol. 7, No. 2, 47 – 56.
28. **Suzuki, S.** 1994. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Int.J.Food Microbiol*, Jan;21(1-2):89-105.
29. **Truscott, R. B.** 1956. *Salmonella moscow* Isolated from Ducks in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, September, 1956, Vol.XX, No.9, 345-346.
30. **Weeks, C. G., H. J. Hutcheson, L. M. Kim, D. Bolte, J. Traub-Dargatz, P. Morley, B. Powers, and M. Jenssen.** 2002. *Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of Salmonella spp.* *J. Clin. Microbiol.* 36: 1487-1492.