

## Identifikasi *Salmonella sp* Pada Jajanan Jus Buah di Kecamatan Gunungpati Semarang dengan PCR

B A S Hermono <sup>✉</sup>, S H Bintari, D Mustikaningtyas

Jurusan Biologi, FMIPA, , Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### Info Artikel

*Sejarah Artikel:*

Diterima 11 Juli 2017

Disetujui 23 September 2017

Dipublikasikan 1 Oktober 2017

*Keywords:*

*Salmonella sp, fruit juices, Gunungpati Sub District*

### Abstrak

Berdasarkan hasil observasi dua puskesmas di Kecamatan Gunungpati ditemukan tingginya tingkat kejadian rata-rata penyakit tifus pada tahun 2011-2016. Tujuan penelitian ini mengidentifikasi *Salmonella sp* pada jajanan jus buah di Kecamatan Gunungpati menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan mengkonfirmasi keberadaan *Salmonella sp* menggunakan medium *triple sugar iron agar* (TSIA). Sampel diperoleh dari 17 jajanan jus buah yang dijual di wilayah Kecamatan Gunungpati Semarang. Sampel diisolasi DNAny menggunakan metode *chelex 100-microwave*, dilanjutkan PCR dengan primer *invA 1* dan *invA 2*, dan uji konfirmasi menggunakan medium TSIA. Hasil amplifikasi dengan primer *invA 1* dan *invA 2* menunjukkan tiga sampel jajanan jus buah positif *Salmonella sp* dengan terbentuknya pita DNA 244 bp. Hasil uji konfirmasi menunjukkan tiga sampel tersebut mengalami perubahan warna medium TSIA dengan kriteria *slant* berwarna merah, *depth* kuning, terbentuk gas, dan ada endapan hitam (H<sub>2</sub>S). Berdasarkan hasil PCR dan konfirmasi kultur pada medium TSIA menunjukkan bahwa 3 dari 17 sampel jus buah positif terkontaminasi *Salmonella sp*.

### Abstract

Based on the observation from two clinics in Gunungpati Sub District, there was found high rates of thypus disease in the year 2011-2016. The purpose of this research was to identify *Salmonella sp* inside the fruit juice sold in Gunungpati Sub District by using PCR and to confirm the presence of *Salmonella sp* using Triple Sugar Iron Agar (TSIA) medium. The samples were collected from 17 fruit juices sold in Gunungpati Sub District, Semarang. The DNA were isolated by chelex 100-microwave methode, continued by testing using PCR with *invA 1* and *invA 2* primer, and confirmation test using TSIA medium. The result from DNA amplification showed that three samples of fruit juice positively contaminated by *Salmonella sp* which proved with the formation of DNA strand 244 bp, whereas the result of confirmation test showed that three samples underwent color changing of TSIA medium with the criteria red colored slant, yellow colored depth, the presence of gas, and black precipitation (H<sub>2</sub>S). Based on PCR test which confirmed by TSIA medium, three out of 17 samples of fruit juices positively contaminated by *Salmonella sp*

© 2017 Universitas Negeri Semarang

<sup>✉</sup> Alamat korespondensi:

E-mail: [benina08@gmail.com](mailto:benina08@gmail.com)

## PENDAHULUAN

Gunungpati merupakan salah satu kecamatan yang mengalami peningkatan ekonomi cukup pesat. Salah satu faktor peningkatan ekonomi adalah keberadaan Universitas Negeri Semarang (UNNES). Keberadaan UNNES memberikan dampak pada lingkungan dengan meningkatnya jumlah penjual makanan dan minuman. Banyaknya penjual menyebabkan sulit mengontrol makanan dan minuman supaya terbebas dari bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit bagi konsumen. Salah satu penyakit yang disebabkan bakteri patogen karena konsumsi makanan atau minuman yang tidak higienis adalah tifus. Berdasarkan hasil observasi dua puskesmas di Kecamatan Gunungpati diketahui bahwa rata-rata kejadian tifus selama tahun 2011-2016 berjumlah 630 orang.

Salah satu jajanan minuman yang digemari oleh sebagian mahasiswa adalah jus buah, dengan pertimbangan harga yang relatif murah, preparasi cepat, dan mudah cara konsumsinya. Menurut SNI 3719:2014, minuman jus buah adalah minuman ringan yang dibuat dari sari buah dan air dengan atau tanpa penambahan gula dan bahan tambahan makanan yang diizinkan (BSN 2014). Bahan makanan atau minuman yang memiliki kandungan air tinggi merupakan media yang disenangi bakteri. Beberapa bakteri patogen yang sering ditemukan pada makanan dan minuman adalah golongan Enterobacteriaceae pathogen, meliputi *Shigella sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* (BPOM RI 2008).

Pengujian keberadaan *Salmonella sp* pada makanan dan minuman rutin dilakukan di seluruh dunia. Pengujian secara mikrobiologis dengan cara kultur umum dilakukan untuk mendeteksi *Escherichia coli* dalam sampel makanan atau minuman. Kelebihan metode ini memiliki biaya murah, tetapi memiliki kelemahan memerlukan waktu yang lama ( $\pm$  5-

7 hari) sampai mendapatkan hasil positif dan hanya bakteri hidup yang dapat tumbuh (Sudian 2008).

Pendekatan secara molekuler dengan amplifikasi gen spesifik *Salmonella sp* dengan polymerase chain reaction (PCR) terbukti lebih sensitif, spesifik, dan cepat dalam mendeteksi keberadaan *Salmonella sp* pada sampel makanan atau minuman. Metode ini masih memiliki kelemahan biaya yang mahal (Prayoga & Agustin 2015). Upadhyay *et al.* (2010) mendeteksi gen *invA Salmonella* pada kultur pengayaan udang dengan PCR menggunakan referensi primer Rahn *et al.* (1992). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa 18% (14 dari 79 sampel udang windu hitam) positif *Salmonella sp* dan 48% (10 dari 21 sampel udang putih) positif *Salmonella sp*. Amalia (2013) mendeteksi *Salmonella spp.* pada sampel udang segar menggunakan referensi primer Rahn *et al.* (1992), dan hasilnya menunjukkan 100% (16 sampel) udang segar positif terkontaminasi *Salmonella sp*.

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi *Salmonella sp* pada jajanan minuman jus buah di Kecamatan Gunungpati dengan metode PCR, hasil PCR diperkuat dengan uji konfirmasi menggunakan medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA). Penggunaan metode ini dilakukan untuk mendapatkan hasil dengan akurasi baik.

## METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium mikrobiologi molekuler FK UNDIP untuk proses isolasi DNA dan amplifikasi DNA dengan PCR, kemudian dilanjutkan uji konfirmasi secara mikrobiologis menggunakan medium TSIA di Laboratorium Mikrobiologi UNNES.

Preparasi sampel dilakukan dengan pengumpulan 17 sampel jajanan jus buah di wilayah Kecamatan Gunungpati secara acak tanpa memperhatikan kondisi higienitas. Pengambilan sampel dipertahankan seperti kondisi awal menggunakan bungkus tertutup

untuk menghindari kontaminasi lain (Arum 2008).

Isolasi DNA dilakukan dengan metode chelex 100-*microwave* yang telah dimodifikasi. Sampel di-vortex sebentar, kemudian disentrifuse 10.000 rpm selama 5 menit. Peletnya ditambah TES 50 µl dan *lysozym* 50 µl. Selanjutnya dipanaskan pada *microwave* selama 4 menit dengan daya 625 W, kemudian ditambah 15 µl proteinase-K dan 2 µl RNase A. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit, kemudian dipanaskan pada *microwave* selama 4 menit dengan daya 625 W. Selanjutnya ditambah 150 µl TE pH 8 dan 100 µl chelex, kemudian di-vortex dan dipanaskan di *microwave* selama 4 menit dengan daya 625 W. Selanjutnya disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke *tube* baru dan ditambahkan 50 µl sodium asetat 10% dan 1000 µl etanol 95% dingin, kemudian digoyang secara perlahan sampai terlihat benang-benang DNA. Setelah dimasukkan dalam *Freezer* selama 10 menit, disentrifuse selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Hasilnya terbentuk 2 lapisan, bagian pelet dicuci dengan 1000 µl etanol 70% dingin. Selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dan dikeringkan dengan posisi *tube* terbalik pada suhu ruang selama 1 hari. Kemudian ditambah 50 µl aquabides (Bintari *et al.* 2014).

Pengecekan kualitatif DNA hasil isolasi menggunakan elektroforesis gel agarose 0,8 % selama 35 menit dengan voltase 220 V. Secara kuantitatif diukur konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop dengan program Es-Tab.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan primer invA-1 (ACAGTGCTCGTTTACGACCTGA AT) dan invA-2 (AGACGACTGGTACTGATCGAT AAT). Reaksi PCR dibuat dengan komposisi 6,25 µl *dream taq green* master mix (2x), 1 µl DNA, 1 µl primer invA 1, 1 µl primer invA 2 dan 3,25 µl aquades. Program PCR dilakukan

dengan 30 siklus dengan suhu pradenaturasi 94°C selama 1 menit; denaturasi 94°C selama 30 detik; *annealing* 56°C selama 30 detik; *extension* 72°C selama 2 menit; dan *final extension* 72 °C selama 10 menit (Liu & Ou 1996). PCR juga dilakukan pada kontrol positif (*Salmonella typhimurium*) dan kontrol negatif (*Escherichia coli*).

Hasil PCR divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarose 1,2%, dengan marker penanda 100 bp. Sebanyak 5 µl hasil PCR dicampur dengan buffer *loading* 2 µl dan dimasukkan ke sumur gel agarose 1,2% dalam 1x buffer TAE dan Etidium Bromida (EtBr). Elektroforesis dilakukan dengan voltase 50 V selama 35 menit. Pita-pita DNA yang terbentuk diamati pada UV-transiluminator. Fragmen DNA yang tervisualisasi dibandingkan dengan marker dan kontrol positif *Salmonella typhimurium*. Terbentuknya pita DNA 244 bp menunjukkan sampel positif *Salmonella sp.*

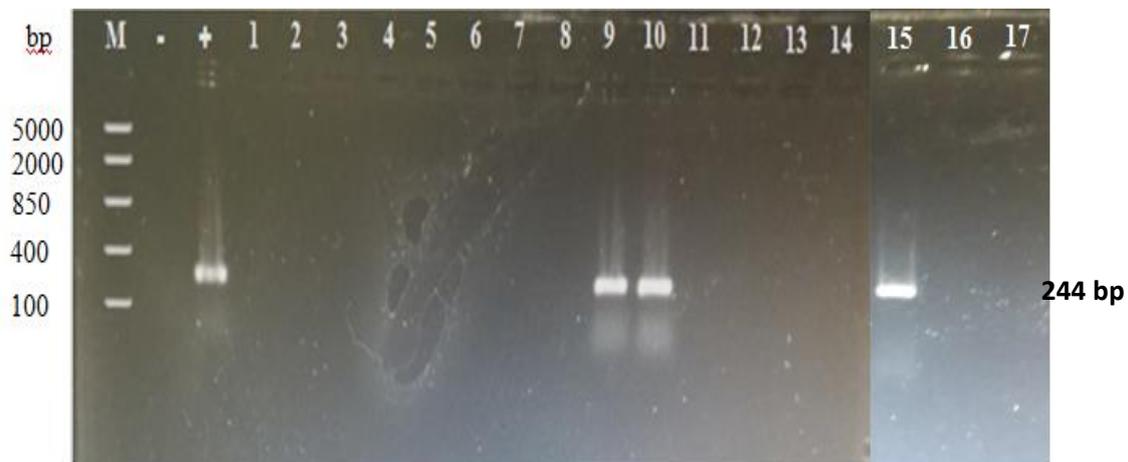
Uji konfirmasi secara kultur dilakukan dengan cara medium TSIA steril dituang ke dalam tabung reaksi 5 ml dan dimiringkan. Pengkulturan dilakukan dengan metode tusuk sampai bagian *depth* dan dilakukan goresan zig-zag pada bagian *slant*. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Positif *Salmonella sp* ditunjukkan dengan kriteria perubahan warna medium *slant/depth* (merah/kuning), terbentuk gas, dan endapan hitam (H<sub>2</sub>S).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses isolasi DNA menentukan keberhasilan proses PCR. Metode chelex 100-*microwave* membutuhkan waktu lebih singkat (30-45 menit), mampu bekerja pada rentang pH 2-14, harganya relatif murah, dan mampu melindungi sampel dari enzim DNase yang mampu mengurangi kuantitas DNA karena memotong DNA menjadi fragmen kecil (Marwayana 2015).

PCR berhasil dilakukan dengan primer invA 1 dan invA 2. Gen invA dari genus *Salmonella sp* mengandung urutan sekuen nukleotida unik dan terbukti cocok sebagai standar target potensial diagnosis menggunakan PCR. Gen ini dikenal sebagai standar internasional untuk deteksi genus *Salmonella* (Malorny *et al.* 2003). Hasil PCR

menunjukkan bahwa dari tujuh belas sampel yang diperiksa, tiga sampel jajanan jus buah yaitu sampel 9, 10, dan 15 positif terkontaminasi *Salmonella sp*, yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA berukuran 244 bp (Gambar 1).



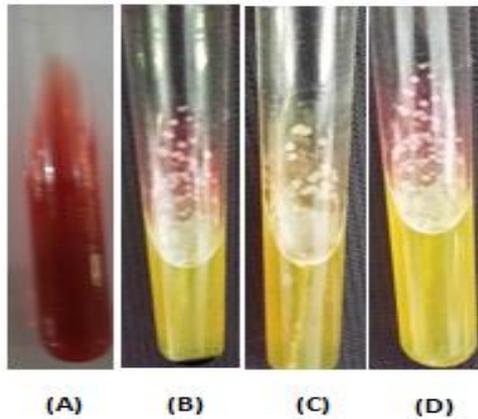
**Gambar 1.** Hasil visualisasi PCR dengan primer invA 1 dan invA 2 pada elektroforesis gel agarose 1,2 %. M: DNA marker (*middle range*) 100 bp; 1-17: Sampel; -: kontrol negatif (*E.coli*); (+) kontrol positif (*S.typhimurium*).

Elektroforesis gel agarose 1,2 % yang berperan memisahkan DNA berdasarkan besarnya pasangan nukleotida penyusun DNA tersebut. Pasangan basa nukleotida dengan ukuran kecil lebih mudah bermigrasi ke kutub positif, sedangkan pasangan nukleotida dengan ukuran besar lebih sulit bermigrasi. Visualisasi pita DNA menggunakan etidium bromide (EtBr), karena EtBr dapat menyala dibawah UV (Brody & Kern 2004).

Gambar 1 menunjukkan bahwa tiga sampel (9,10, dan 15) terbentuk pita DNA dengan ukuran 244 bp yang berwarna putih dan tebal. Hal ini menunjukkan pasangan primer yang digunakan menempel pada posisi yang ditargetkan. Primer invA 1 merupakan nukleotida ke 104-127, sedangkan primer invA2 merupakan nukleotida ke 324-347 yang membatasi ujung *forward* 3' dan 5' serta ujung *revers* 5' dan 3'. Penempelan primer pada sekuen DNA terjadi pada basa-basa nukleotida yang ditargetkan milik *Salmonella sp*, sehingga hanya bagian spesifik saja yang

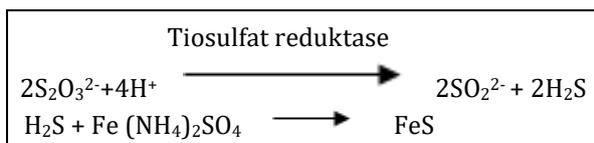
teramplifikasi. Empat belas sampel lainnya tidak terbentuk pita DNA 244 bp yang menunjukkan tidak adanya kontaminasi *Salmonella sp*. Hal ini didukung dengan terbentuknya pita DNA 244 bp pada kontrol positif (*Salmonella typhimurium*), sedangkan kontrol negatif (*Escherichia coli*) tidak membentuk pita 244 bp.

Pengujian dilanjutkan dengan uji konfirmasi menggunakan medium TSIA. Uji konfirmasi dilakukan untuk mendukung data hasil PCR, sehingga data menjadi akurat. Medium TSIA merupakan medium selektif diferensial yang direkomendasikan European Pharmacopoeia sebagai salah satu media untuk konfirmasi *Salmonella sp*. Medium TSIA mengandung laktosa, glukosa, sukrosa, ion besi, dan tiosulfat serta indikator *phenol red*. Proses fermentasi gula akan mengindikasikan kondisi medium. Hasil inkubasi 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan perubahan warna medium yang berbeda-beda pada setiap sampel. Hasil kultur pada medium TSIA terlihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil uji konfirmasi menggunakan medium TSIA. A. medium TSIA tanpa inokulasi sampel (Kontrol); B. sampel positif *Salmonella sp*; C. sampel positif *E.coli*; D. sampel positif *Shigella flexneri*

Sampel 1,4,6,7,8,12,14, dan 16 menunjukkan positif *E.coli* dengan kriteria *slant/depth* (kuning/kuning) dengan perubahan medium dari merah (basa) menjadi kuning (asam). Hal tersebut menunjukkan *E.coli* mampu memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa. *E.coli* mampu menghasilkan gas karena hasil fermentasi karbohidrat yang mengakibatkan retak pada media, tetapi tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S (Lebbofe & Pierre 2011). Sampel 2, 3, 5, 11, 13, dan 17 menunjukkan positif *Shigella flexneri* dengan kriteria *slant/depth* (merah/kuning). Perubahan *depth* dari merah menjadi kuning menunjukkan *Shigella flexneri* hanya mampu memfermentasi glukosa tanpa menghasilkan gas dan H<sub>2</sub>S (Tantri 2016). Sampel 9,10, dan 15 positif *Salmonella sp* dengan kriteria *slant/depth* (merah/kuning). Pada bagian *depth* terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning yang menunjukkan *Salmonella sp* hanya mampu memfermentasi glukosa, sedangkan bagian *slant* tetap merah. Terbentuk gas dari fermentasi H<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> yang ditunjukkan dengan retaknya medium, dan membentuk H<sub>2</sub>S atau endapan hitam (Goldman & Lorrence 2015). Reaksi terbentuknya H<sub>2</sub>S sebagai berikut:



Faktor penyebab adanya *Salmonella sp* pada jajanan jus buah di Kecamatan Gunungpati antara lain bahan baku pembuatan jus buah, peralatan yang digunakan, penjual jus buah, dan lokasi penjualan jus buah (Lund *et al.* 2000). Jajanan jus buah dimungkinkan mengalami kontaminasi lebih dari satu jenis bakteri, tetapi faktor-faktor lain seperti viabilitas dan jumlah sel dapat menyebabkan tidak terlihatnya jenis bakteri lain, sehingga yang terlihat hanya bakteri dominan (positif semu).

## SIMPULAN

Hasil PCR dan uji konfirmasi kultur pada medium TSIA menunjukkan bahwa tiga dari 17 sampel jus buah yang dijajakan di wilayah Kecamatan Gunungpati positif *Salmonella sp*.

## DAFTAR PUSTAKA

Amalia U. 2013. Optimasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Deteksi *Salmonella* spp. pada Udang Segar. *Tesis*. Institut Teknologi Bandung

Arum W. 2008. Deteksi bakteri *Salmonella* pada sampel makanan dan minuman dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. *Skripsi*. Depok: FMIPA Universitas Indonesia

Bintari SH, Fibriana F, Dewi M, Iswari RS. 2014. PCR approach for rapid detection of *Escherichia coli* in tempe using a specific primer. *J Biological Researches*. 19: 54-59

[BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2008. Pengujian mikrobiologi pangan. *Journal Info POM* 9 (1).

[BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2014. SNI. 3719-2014: Minuman sari buah. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional

Goldman E, & Lorrence HG. 2015. *Practical handbook of microbiology*. Third edition. Francis: CRC Press

Lebbofe MJ, & Pierre BE. 2011. *A photo graphic atlas for the microbiology laboratory*. Morton Publishing Company

Liu CH, & Ou JT. 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*. 34: 2619-1622

Lund BM, Baird-Parker TC, & Gould GW. 2000. *The microbiological safety and quality of food*. Maryland: Aspen Publishers, inc

- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, & Helmuth R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard appl environ. *Microbiol.* 69(1): 290-296
- Marwayana ON. 2015. Ekstraksi asam Deoksiribonukleat (DNA) dari sampel jaringan otot. *Jurnal oseana.* 11(2): 1-9
- Prayoga W, & Agustin K.W. 2015. *Polymerase Chain Reaction* untuk deteksi *Salmonella sp.* *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* 3(2): 438-488
- Rahn K, DeGrandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginnocch OC, Curtissii R, & Gyles CL.1992. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by Polymerase Chain Reaction as a specific methode of detection of *Salmonella.* *J Mol Cell Probes.* 6: 271-279
- Sudian S. 2008. Pengujian mikrobiologi pangan. *Jurnal Info POM* 9(2): 1-9
- Tantri BUN. 2016. Identifikasi bakteri *Escherichia coli*, *Shigella sp*, dan *Salmonella sp* pada air sumur di wilayah pembuangan limbah tahu dan limbah ikan Kota Bandar Lampung. *Skripsi.* Lampung: Universitas Lampung.
- Upadhyay BP, Fuangfa U, Jarinee T, Yuvadee M, Niracha W, & Srisin K. 2010. Detection of *Salmonella invA* gene in shrim enrichment culture by *Polymerase Chain Reaction.* *J Trop Med Public Health.* 41(2): 427-435