

## Analisis Spesifisitas Primer Deteksi *Salmonella typhimurium* dengan Metode Real-Time PCR

**Fini Ainun Qolbi Wasdili**

Program Studi Analisis Kesehatan D3, Stikes Jenderal Achmad Yani Cimahi

Email: fini.ainun@gmail.com

**Abstrak:** Untuk meningkatkan akurasi deteksi *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium*), perlu dikembangkan metode deteksi yang spesifik dan cepat. Metode yang dapat digunakan adalah Real-Time PCR. Primer menentukan keberhasilan amplifikasi DNA target pada metode Real-Time PCR. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesifisitas primer deteksi *S.typhimurium* dengan metode Real-Time PCR. Analisis spesifisitas dilakukan dengan menguji primer pada DNA *S.typhimurium* sebagai kontrol positif serta *Shigella* sp dan *E.coli* sebagai kontrol negatif. Tahapan uji terdiri dari konfirmasi kultur bakteri *S.typhimurium*, ekstraksi DNA, analisis DNA dan analisis spesifisitas primer. Berdasarkan hasil penentuan kemurnian DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi berada pada rentang 1,8-2,0. Hasil analisis spesifisitas menggunakan aplikasi online NCBI diperoleh %GC berada diantara 40-60% dengan suhu leleh antara 52-58°C. Pengujian spesifisitas primer dengan metode Real-Time PCR diperoleh nilai *Cycle threshold* (Ct) *S.typhimurium*  $\leq 29$ .

**Kata Kunci :** Spesifisitas, Primer, *Salmonella typhimurium*, Real-Time PCR

### PENDAHULUAN

*Salmonella* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang bersifat patogen dan dapat menginfeksi manusia melalui perantara hewan (Yosua, 2018). Infeksi yang disebabkan *Salmonella* disebut salmonellosis. Infeksi kronis salmonellosis dapat menyerang organ tubuh dan terdapat dalam aliran darah. Kejadian infeksi salmonellosis relatif stabil dengan tingkat keracunan yang tinggi (Rahmaniar, Tintin, & Wasdili, 2014; Yosua, 2018). Kasus keracunan pangan yang dilaporkan BPOM pada tahun 2016 terdapat 3351 orang menderita sakit dan 7 orang meninggal dunia dari jumlah 5673 yang terpapar. Tahun 2016 persentase keracunan mencapai 46,67% adalah yang paling besar dibandingkan tahun sebelumnya. Salah satu penyebab kasus tersebut adalah salmonellosis,

yaitu dengan angka kejadian 3 kasus dari 26 kasus tahun 2016. Salah satu spesies bakteri yang dapat menyebabkan salmonellosis adalah *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) (BPOM, 2016).

Kasus keracunan pangan dapat diantisipasi dengan melakukan pemeriksaan mikroba patogen. Metode yang digunakan untuk pemeriksaan harus cepat dan spesifik. Metode yang umum digunakan adalah metode konvensional mikrobiologi dengan waktu kurang lebih 3 hari. Dengan berkembangnya teknologi di bidang mikrobiologi, PCR menjadi salah satu metode alternatif yang cepat dan spesifik. Metode PCR adalah teknik biologi molekuler dengan memperbanyak DNA menjadi jutaan salinan DNA. Metode PCR sangat aplikatif digunakan dalam analisis dan diagnosis suatu penyakit (Joshi & Deshpande, 2010).

Interpretasi hasil metode PCR dilihat dengan adanya pita spesifik hasil amplifikasi DNA target setelah proses PCR berakhir. Deteksi PCR saat ini dapat diamati secara langsung dengan menggunakan Real-Time PCR. Metode Real-Time PCR merupakan modifikasi metode dari PCR, dimana proses amplifikasi dapat diamati pada setiap siklus dan hasil amplifikasi dapat dikuantifikasi (Kralik & Ricchi, 2017).

Metode Real-Time PCR dapat digunakan sebagai metode diagnosa *S. typhimurium* dengan cepat dan spesifik. Analisis spesifik metode PCR tergantung dari primer pemeriksaan yang digunakan, semakin spesifik primer maka semakin akurat pemeriksaan tersebut. Primer dirancang agar komplemen dengan DNA target, terdiri dari 20 – 30 basa dengan kriteria tertentu. Perancangan primer tergantung dari beberapa parameter yaitu, panjang primer, kandungan basa guanin dan sitosin (%GC) serta derajat komplemen dengan target DNA. (Apte & Daniel, 2009; Burpo, 2001; Design, Pcr, & Pcr, 2017).

Berdasarkan latar belakang diatas, untuk menentukan apakah primer untuk deteksi *S. typhimurium* yang akan digunakan spesifik, diperlukan analisis spesifisitas primer dengan menggunakan bakteri positif yaitu *S. typhimurium* dan bakteri negatif sebagai pembanding yaitu bakteri *Shigella* sp dan *Escherichia coli* (*E.coli*).

## **METODE**

Penelitian merupakan penelitian eksperimental, dilakukan di laboratorium

Poltekkes Bandung. Pada penelitian ini dilakukan dengan cara menguji amplifikasi primer pada bakteri kontrol positif dan bakteri kontrol negatif. Bakteri kontrol positif yang digunakan adalah bakteri *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan bakteri kontrol negatif yang digunakan adalah bakteri dari genus berbeda yaitu *Shigella* sp dan *Escherichia coli* (Yosua, 2018).

Pada penelitian ini dilakukan 3 tahap yaitu tahap konfirmasi kultur bakteri, tahap ekstraksi DNA bakteri dan analisis DNA serta analisis spesifisitas primer. Tahap konfirmasi kultur dilakukan dengan menumbuhkan bakteri *S. typhimurium* pada media *Rappaport-Visiliadis* (RV) dan media *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLDA), sedangkan untuk *Shigella* sp ditumbuhkan pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dan *E.coli* ditumbuhkan pada media *MacConkey Agar* (MCA). Koloni spesifik selanjutnya ditumbuhkan pada media perbenihan *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Standar Nasional Indonesia, 2008).

Tahap kedua dilakukan ekstraksi DNA dari kultur bakteri pada media TSB. Metode ekstraksi DNA dengan menggunakan kit komersial yang terdiri dari 4 tahap yaitu pembuatan sel lisat, pengikatan DNA, pembilasan DNA dan elusi DNA. tahap pembuatan lisat dilakukan dengan sentrifugasi kultur TSB kemudian menambahkan Digestion buffer dan Proteinase K kedalam pelet sel, setelah homogen ditambahkan *lysis buffer* dan etanol 96%. Pengikatan DNA dilakukan dengan memasukkan lisat kedalam spin kolom

kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 g. Pembilasan DNA dilakukan dengan menambahkan *wash buffer* 1 lalu disentrifugasi, selanjutnya ditambahkan *wash buffer* 2 kemudian sentrifugasi kembali. Spin kolom yang sudah dibilas selanjutnya ditambahkan *elution buffer* untuk elusi DNA dan spin kolom disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 1 menit (Diversity, 2007).

Kemurnian DNA ditentukan dengan menentukan rasio absorbansi DNA pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 dan 280 menggunakan spektrofotometer. DNA dengan kemurnian antara 1,8-2,0 digunakan untuk analisis spesifisitas primer dengan metode Real-Time PCR. Kondisi dan siklus Real-Time PCR diatur sesuai dengan hasil optimasi primer yang sudah dikerjakan oleh Rahmaniari, Tintin, & Wasdili (2014). Suhu penempelan yang digunakan adalah 56,3°C selama 20 detik pada Tabel 1. Urutan DNA primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer forward 5'CCAAATAAATATCCTCCGGC3' sedangkan untuk urutan DNA primer reverse 5'TGCAAATGTCAGATCGTATG3'.

**Tabel 1. Kondisi *Running* Real-Time PCR**

Tahap	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Jumlah Siklus
Pre-denaturasi	95	180	40
Denaturasi	95	2	40
Penempelan	56,3	20	40
Pemanjangan	72	5	40

Spesifisitas ditentukan dengan melihat perubahan sinyal fluoresensi selama proses

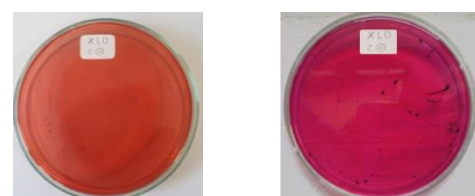
amplifikasi melalui grafik real-time PCR dan nilai *Cycle threshold* (Ct). Analisis spesifisitas primer diuji juga dengan menggunakan aplikasi online dari NCBI.

## HASIL

Konfirmasi kultur bakteri dengan menumbuhkan pada media selektif RV (Gambar 1) yang dihasilkan terdapat kekeruhan pada media yang mengandung bakteri dan pada media XLDA terdapat koloni berwarna hitam (Gambar 2).



**Gambar 1. Media RV tanpa pertumbuhan bakteri (Kiri) dan Media RV dengan Pertumbuhan bakteri *S. typhimurium*.**



(1) (2)

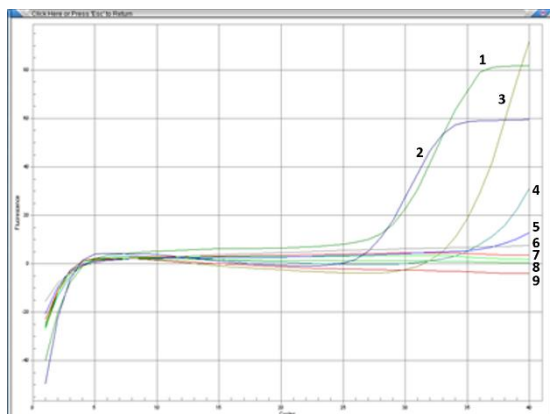
**Gambar 2. Media XLDA tanpa Pertumbuhan Bakteri (1) dan Media XLDA dengan Pertumbuhan Bakteri *S. typhimurium* (2)**

Penentuan kemurnian DNA dengan rasio A260/A280 hasil ekstraksi DNA pada kultur bakteri *S.typhimurium* (1-3), *Shigella* sp (4-6) dan *E.coli* (7-9) adalah sebagai berikut :

**Tabel 2. Nilai Rasio Kemurnian DNA**

DNA	Absorban $\lambda_{260}$	Absorban $\lambda_{280}$	Rasio
1	0,0111	0,0059	1,88
2	0,0108	0,0059	1,83
3	0,0108	0,0059	1,83
4	0,0106	0,0057	1,86
5	0,0107	0,0057	1,88
6	0,0111	0,0058	1,91
7	0,0108	0,0058	1,86
8	0,0106	0,0056	1,89
9	0,0107	0,0056	1,91

Kemurnian DNA masing-masing bakteri memenuhi kriteria kemurnian DNA yaitu rasio A260/A280 adalah antara 1,8-2,0 dengan nilai rasio terkecil 1,83 dan rasio tertinggi 1,91. DNA murni digunakan untuk analisis spesifisitas primer menggunakan Real-Time PCR dengan hasil pada Gambar 3.



**Gambar 3. Grafik Hasil Real-Time PCR**

Hasil amplifikasi menunjukkan terdapat sinyal fluoresensi pada DNA bakteri

*S.typhimurium* (1-3) dan *Shigella* sp (4) sedangkan pada DNA bakteri *Shigella* sp (5-6) dan *E.coli* (7-9) tidak menunjukkan adanya sinyal fluoresensi.

**Tabel 3. Nilai Cycle Treshold (Ct)**

Nomor grafik	Nilai Ct
1	25
2	26
3	29
4	38
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-

## PEMBAHASAN

Hasil konfirmasi bakteri pada gambar 1 dan 2, *S. typhimurium* yang ditumbuhkan pada media RV terjadi perubahan media dari larutan biru jernih menjadi biru keruh. Kekeruhan menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *S.typhimurium* karena media RV merupakan salah satu media perbenihan selektif untuk *S.typhimurium* (Gorski, 2012). Kultur bakteri pada media RV selanjutnya ditumbuhkan pada media XLD. Media XLD yang positif mengandung pertumbuhan *S.typhimurium* terbentuk koloni berwarna merah muda dengan titik hitam pada koloni (Yosua, 2018). Koloni bakteri yang sudah sesuai pada media selektifnya selanjutnya ditumbuhkan pada media TSB. Media TSB merupakan media perbenihan universal. Pertumbuhan bakteri pada media TSB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan setelah inkubasi selama 18-24 jam.

Kultur bakteri pada media TSB digunakan sebagai sumber DNA bakteri. Untuk mendapatkan DNA bakteri pada penelitian ini dilakukan tahap ekstraksi DNA dengan metode spin kolom menggunakan kit komersial. Prinsip metode ekstraksi dilakukan dengan melisis sel bakteri dan memisahkan DNA dari komponen sel menggunakan kolom serta selanjutnya elusi DNA dari kolom. Tahapan ekstraksi DNA terdiri dari pembuatan sel lisat, pengikatan DNA, pembilasan DNA dan elusi DNA. Pembuatan sel lisat bertujuan untuk melisis sel bakteri sehingga DNA bakteri bisa keluar dari sel. DNA yang sudah keluar dari sel selanjutnya berikatan dengan komponen dalam kolom sedangkan komponen selain DNA akan lolos melewati kolom. Kolom yang sudah berikatan dengan DNA selanjutnya dibilas untuk memastikan tidak ada komponen lain yang akan mengkontaminasi DNA. Pada tahap elusi DNA, DNA ditambahkan *Elution Buffer* yang dapat melarutkan DNA dari kolom (Tan & Yiap, 2009).

Ekstraksi DNA dilakukan pada kultur bakteri *S. typhimurium*, *Shigella* sp dan *E.coli*. Pada Tabel 2 DNA hasil ekstraksi ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 260 dan 280 untuk menentukan kemurnian DNA. Pada panjang gelombang 260, DNA dapat menyerap sinar UV karena mengandung basa purin dan pirimidin. Pada panjang gelombang 280, protein dan kontaminan fenol dapat menghasilkan nilai absorban. Nilai teoritis rasio kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 sedangkan pada hasil ekstraksi DNA diperoleh

nilai rasio terkecil 1,83 dan tertinggi 1,91 dengan rata-rata kemurnian 1,87. Nilai tersebut berada pada rentang rasio DNA murni, sehingga dapat dikatakan bahwa DNA hasil ekstraksi adalah murni (Butler, 2011; Rice, 2015; Wilmington, 2007).

DNA bakteri merupakan sampel yang mengandung urutan DNA target yang di amplifikasi. Dalam proses amplifikasi, bahan yang diperlukan agar proses berjalan adalah enzim DNA polimerase, dNTP, Buffer dan  $MgCl_2$  serta primer forward dan primer reverse. Primer digunakan sebagai inisiasi proses amplifikasi pada tahap annealing. Apabila dalam tahap annealing, primer tidak menempel pada DNA target maka proses amplifikasi tidak akan berlangsung. Untuk meningkatkan keberhasilan amplifikasi diperlukan primer yang spesifik.

Spesifisitas primer adalah parameter kritis yang menentukan keberhasilan dari amplifikasi gen target. Dalam merancang primer, harus diperhatikan beberapa parameter yang dapat mempengaruhi spesifisitas primer. Primer yang baik memiliki kriteria dengan panjang 18-30 pasang basa, suhu leleh dari primer antara 52-58°C, selisih suhu leleh antara primer forward dan primer reverse adalah 6 °C, dan kandungan %GC 40-60%. Penentuan kriteria dapat ditentukan dengan menggunakan aplikasi online. Aplikasi online yang digunakan dalam penelitian ini adalah NCBI. Hasil pengujian primer menunjukkan %GC primer reverse 40% dan 45% untuk primer forward. Suhu leleh dari primer reverse adalah 53,82 °C dan suhu leleh dari primer

forward adalah 53,89 °C serta selisih suhu leleh yang kurang dari 6 °C. Berdasarkan hasil pengujian tersebut primer reverse dan primer forward sesuai dengan kriteria dari primer yang baik. Untuk membuktikan spesifisitas primer ini benar, dilakukan analisis spesifisitas primer dengan menggunakan bakteri lain sebagai DNA target. Bakteri *Shigella* sp dan *E.coli* dipilih karena bakteri memiliki kekerabatan yang dekat dengan *S.typhimurium* berdasarkan filogenik.

Primer selanjutnya digunakan untuk mendeteksi bakteri *S.typhimurium* sebagai kontrol positif sedangkan bakteri *Shigella* sp dan *E.coli* sebagai kontrol negatif. Secara teoritis, pemeriksaan dengan metode PCR, memiliki akurasi, sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi dibandingkan dengan metode lain, hal tersebut disebabkan primer spesifik yang digunakan untuk mendeteksi. Pada penelitian ini digunakan metode Real-Time PCR yang merupakan modifikasi dari metode PCR. Keberadaan DNA hasil amplifikasi diamati secara langsung melalui grafik fluoresensi. Pada penelitian ini digunakan SYBR Green sebagai zat fluoresen.

Berdasarkan gambar 3 hasil amplifikasi menggunakan Real-Time PCR menunjukkan adanya fluoresensi pada hasil amplifikasi 1-4, sedangkan pada no 5-9 tidak dihasilkan fluoresensi. Hasil amplifikasi DNA no 1-3 adalah DNA dari bakteri *S.typhimurium*. Nilai Ct grafik 1-3 adalah kurang darisama dengan 29 artinya reaksi positif kuat dan menunjukkan terdapat DNA hasil amplifikasi target. Pada hasil amplifikasi DNA no 4 yang berasal dari

DNA *Shigella* sp, menunjukkan adanya fluoresensi yang meningkat setelah siklus ke 38, dengan nilai Ct adalah 38. Nilai Ct antara 38-40 menunjukkan reaksi lemah yang kemungkinan berasal dari kontaminan lingkungan, sehingga walaupun menunjukkan adanya fluoresensi tetapi secara teoritis tidak dihasilkan DNA amplifikasi dari target.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis spesifisitas dengan menggunakan aplikasi online dan analisis secara langsung yang diuji pada bakteri *S.typhimurium*, *Shigella* sp dan *E.coli* menunjukkan bahwa primer spesifik dapat digunakan untuk deteksi *S.typhimurium*.

## SARAN

Dapat dilakukan verifikasi metode deteksi untuk *S.typhimurium* dengan menggunakan sampel simulasi bahan biologis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 27–32.
- BPOM. (2016). *Laporan Tahunan 2016*.
- Burpo, F. J. (2001). A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. *Computer*, 86(2), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010438>
- Butler, J. M. (2011). DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*, 29–47.
- Design, P. C. R. P., Pcr, C., & Pcr, D. (2017). *PCR Primer Design*.

- Diversity, G. (2007). SMOGD : User Manual Table of Contents. In *PureLink Genomic DNA Kits*.
- Gorski, L. (2012). Selective Enrichment Media Bias the Types of Salmonella enterica Strains Isolated from Mixed Strain Cultures and Complex Enrichment Broths, 7(4).
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *Int J Biomed Res*, 1(5), 81–97.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9.
- Rahmaniar, M., Tintin, G., & Wasdili, F. A. Q. (2014). Optimasi Primer Pemeriksaan Salmonella typhimurium Dengan Metode Kuantitatif REAL-TIME PCR. 2014, 28–39.
- Rice, G. (2015). DNA Extraction. In *Forensic DNA Biology* (pp. 3–5). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3>
- Standar Nasional Indonesia. (2008). Sni 2897:2008.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10.
- Wilmington, D. U. (2007). T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers. *Thermo Fisher Scientific - NanoDrop Products*, 17(1), 86–87.
- Yosua, A. (2018). DETEKSI Salmonella Hadar, Salmonella Typhimurium, dan Salmonella Enteritidis MENGGUNAKAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). Retrieved from <http://e-journal.uajy.ac.id/14649/1/JURNAL.pdf>