

## SIMPLEKS DAN MULTIPLEKS *PRE-ENRICHMENT*-PCR UNTUK DETEKSI *Salmonella* Enteritidis DAN Typhimurium PADA KARKAS AYAM

[*Simplex and Multiplex Pre-Enrichment-PCR for Salmonella Enteritidis and Typhimurium Detection from Chicken Carcasses*]

Siti Nurjanah<sup>1,2)\*</sup>, Winiati P. Rahayu<sup>1,2)</sup>, Ratih Dewanti-Hariyadi<sup>1,2)</sup>, Ni Gusti Ayu Made Widyatari Asthiti<sup>1)</sup>, dan Rahadina Praba Melati<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor

<sup>2)</sup> South East Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, IPB University, Bogor

13 November 2020 / Disetujui 27 November 2021

### ABSTRACT

A PCR assay has been developed and applied to detect *Salmonella* contamination in chicken carcasses. However, a concentration fewer than 3 cells per gram lead to false-negative results due to difficulties in the DNA extraction. The objective of this study was to evaluate of the influence of pre-enrichment on the sensitivity of simplex and multiplex PCR methods the detection of for *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in chicken carcasses. Artificial contamination was done using very low number of *Salmonella* Hadar, *S. Enteritidis* dan *S. Typhimurium* and pre-enrichment was carried out by 8 hours incubation in non-selective (BPW) medium. The results showed that simplex PCR could detect *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* at initial numbers of 2.3, 0.9 and 2.3 MPN/mL of cells in broth medium, respectively. A multiplex PCR could detect mixed culture of the three *Salmonella* serovars at an initial number of 0.73 MPN/mL of cells. When compared to non-enrichment treatment, simplex pre-enrichment-PCR gave an increase in the percentage of positive results in chicken carcasses ( $n=12$ ), from 75 to 100% for *Salmonella* spp., from 8 to 58% for *S. Typhimurium*, and from 58 to 75% for *S. Enteritidis*. Increasing in the positive percentage was also occurred at multiplex pre-enrichment-PCR, however the concentration of *S. Enteritidis* primer was not optimum for detection. Pre-enrichment step significantly increases the sensitivity of PCR-based assay for detection *Salmonella*.

**Keywords:** chicken carcass, PCR, pre-enrichment, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium

### ABSTRAK

Metode PCR telah dikembangkan dan diaplikasikan untuk mendeteksi cemaran *Salmonella* spp. pada karkas ayam. Cemaran *Salmonella* spp. dengan jumlah di bawah 3 sel per gram dapat menimbulkan kesalahan negatif analisis karena kesulitan mendapatkan ekstrak DNA. Tujuan penelitian ini untuk melihat pengaruh perlakuan *pre-enrichment* pada sensitivitas metode analisis simpleks dan multipleks PCR untuk deteksi *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis dan *Salmonella* Typhimurium pada karkas ayam. Konfirmasi limit deteksi dilakukan dengan kontaminasi artifisial *Salmonella* Hadar, *S. Enteritidis* dan *S. Typhimurium* dengan jumlah yang sangat rendah dan *pre-enrichment* dilakukan pada media cair non-selektif *Buffered Peptone Water* (BPW) yang diinkubasi selama 8 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa simpleks *pre-enrichment*-PCR mampu mendeteksi *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* dan *S. Typhimurium* pada jumlah awal 2,3; 2,3; dan 0,9 MPN/mL. Multipleks dapat mendeteksi campuran bakteri tersebut pada jumlah awal 0,73 MPN/mL. Dibandingkan dengan tanpa *enrichment*, simpleks *pre-enrichment*-PCR memberikan peningkatan persentase hasil positif *Salmonella* spp., dari 75 menjadi 100%, positif *S. Typhimurium* dari 8 menjadi 58%, dan positif *S. Enteritidis* dari 58 menjadi 75%. Peningkatan persentase hasil positif juga terjadi pada multipleks *pre-enrichment*-PCR, namun penggunaan konsentrasi primer *S. Enteritidis* belum mampu mendeteksi serovar tersebut secara optimal. Dapat disimpulkan bahwa penggunaan tahap *pre-enrichment* dapat meningkatkan sensitivitas metode PCR secara signifikan.

**Kata kunci:** karkas ayam, PCR, *pre-enrichment*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium

\*Penulis Korespondensi: E-mail: [sity\\_nr@apps.ipb.ac.id](mailto:sity_nr@apps.ipb.ac.id)

## PENDAHULUAN

Karkas ayam merupakan komoditi daging dengan tingkat konsumsi yang tinggi di Indonesia. Berdasarkan hasil Survei Konsumsi Bahan Pokok (VKBP) tahun 2017 dan Survei Sosial Ekonomi Nasional (Susenas) tahun 2019 yang dilaksanakan BPS RI, konsumsi daging ayam ras adalah sebesar 12,79 kg/kapita/tahun (Kementan, 2020), dengan penggunaan untuk konsumsi langsung, HOREKA (hotel, restoran, kafe) dan industri. Data produksi yang tercatat di BPS tahun 2020 sebesar 3,3 juta ton. Karkas ayam yang dijual di Indonesia belum lepas dari bahaya bakteri *Salmonella* spp. (Bakara *et al.*, 2014). Penelitian Safitri *et al.* (2019) menunjukkan sebanyak 32,14% (9 dari 28 sampel) karkas ayam dari pasar tradisional di Pangkal Pinang tercemar *Salmonella* spp. *Salmonella* spp. merupakan bakteri penyebab penyakit salmonellosis yang merupakan *foodborne diarrheal disease* dan bersifat *zoonosis*. Sumber utama infeksi *Salmonella* spp. berasal dari pangan hewani seperti babi, unggas, dan hewan ternak (Eng *et al.*, 2015). Keberadaan *Salmonella* spp. dapat menjadi indikator higienitas pengolahan ayam potong (Utari *et al.*, 2016). Jenis *Salmonella* spp. yang paling banyak menginfeksi manusia adalah jenis *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis* dengan prevalensi infeksi sebesar 79% dari total infeksi *Salmonella* di dunia (WHO, 2014).

Karakterisasi risiko *Salmonella* spp. mencemari daging ayam dapat dilakukan melalui deteksi keberadaan *Salmonella* spp. beserta identifikasi serotipenya pada karkas ayam. Karakterisasi risiko digunakan untuk membuat skala prioritas berdasarkan jenis risiko dari serotipe *Salmonella*. Serotipe yang berbeda dapat menimbulkan gejala yang berbeda, sebagai contoh *S. Typhimurium* yang dapat menunjukkan gejala penyakit baik pada manusia dan ayam sedangkan *S. Enteritidis* hanya menunjukkan gejala penyakit pada manusia dan tidak menunjukkan gejala pada ayam (Crump dan Wain, 2017). Keberadaan *asymptomatic carrier* tersebut dapat mempersulit kontrol dalam pencegahan infeksi (Maciel *et al.*, 2011). Kuantifikasi selanjutnya dapat dilakukan terhadap risiko tersebut sehingga tindakan pencegahan dapat dilakukan lebih efektif. Oleh karena itu, karakterisasi risiko membutuhkan metode deteksi cepat dan spesifik seperti PCR (*polymerase chain reaction*). Metode PCR menggunakan prinsip penggandaan DNA secara *in vitro* sehingga ketika divisualisasi dengan gel elektroforesis dapat terlihat pita dari DNA tersebut (kualitatif) yang dapat dibedakan berdasarkan mobilitas fragmen DNA (Radji *et al.*, 2010; Triyani *et al.*, 2016). Primer spesifik untuk *S. Typhimurium* digunakan adalah STM4497 yang merupakan bagian dari gen penyandi fimbrial yang diduga kuat merupakan gen

protein pada sitoplasma *S. Typhimurium* (Tortajada-Genaro *et al.*, 2015). Sistem multipleks digunakan untuk mendeteksi beberapa strain sekaligus dalam satu kali reaksi PCR, sehingga dapat diketahui serotipe *Salmonella* dengan cepat.

Deteksi *Salmonella* spp. menggunakan PCR pada sampel bahan pangan memerlukan adanya tahapan *enrichment* karena pada umumnya protokol PCR memerlukan konsentrasi mikroorganisme target yang sangat tinggi yang biasanya diperoleh hanya setelah pengayaan sampel (Myint *et al.*, 2006). Metode deteksi menggunakan PCR pada *Salmonella* spp. yang dilakukan tanpa *pre-enrichment* membutuhkan konsentrasi mikroorganisme awal yang tinggi agar dapat terdeteksi yaitu  $10^4$ - $10^5$  sehingga dapat menimbulkan kesalahan analisis negatif (Afendy dan Son, 2012; Saeki *et al.*, 2012; Yosua, 2018). *Salmonella* tidak dapat berkompetisi dengan baik terhadap bakteri-bakteri perusak yang mengontaminasi pangan, oleh karena itu berdasarkan ISO 6579 (2017) tahap *enrichment* dalam media non-spesifik *Buffered Peptone Water* (BPW) atau disebut juga tahap *pre-enrichment* dibutuhkan untuk membantu memperbaiki sel bakteri yang rusak, melarutkan zat penghambat atau zat toksik lainnya, dan juga menyediakan kecukupan nutrisi khususnya bagi *Salmonella*. BPW mengandung pepton sebagai sumber nutrisi berupa nitrogen, karbon, vitamin, dan mineral serta NaCl untuk mempertahankan keseimbangan osmotik dan fosfat sebagai *buffer* (Taskila *et al.*, 2012). Deteksi dengan kuantifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan kuantitatif PCR atau *real-time* PCR (Nurjanah *et al.*, 2018).

Kemampuan deteksi adalah parameter penting untuk metode deteksi bakteri secara kualitatif dan akan meningkat dengan memberikan kesempatan sel memperbanyak diri pada perlakuan prapengayaan atau *pre-enrichment*. Dalam penelitian ini kemampuan deteksi ditentukan dengan pengujian sejumlah sampel dan dinyatakan dengan persentase positif terhadap jumlah sampel total. Tujuan penelitian ini untuk mengukur peningkatan kemampuan deteksi PCR terhadap *Salmonella* Enteritidis dan *Salmonella* Typhimurium secara simpleks dan multipleks dengan perlakuan *pre-enrichment*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan dalam penelitian ini adalah karkas ayam ras (dalam kondisi segar) yang diperoleh dari pasar swalayan dan pasar tradisional di daerah Bogor digunakan untuk tahapan evaluasi sensitivitas dan sampel analisis untuk tahapan aplikasi metode deteksi. Bakteri utama yang digunakan untuk penentuan limit deteksi antara lain *Salmonella enterica* subspecies Hadar (BCC B2908) dari Balai Besar

Penelitian Veteriner (Bbalitvet) yang mewakili jenis *Salmonella* spp. selain *S. Typhimurium* dan *S. Enteritica*, *S. Typhimurium* (ATCC 14028) dari Laboratorium Mikrobiologi SEAFast Center, IPB Bogor, dan *S. Enteritidis* (ATCC 13076) dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) yang berupa *stock freeze*.

### Persiapan kultur

Kultur murni *Salmonella* yang telah diinkubasi selama 18 jam dan dikonfirmasi jumlah mikroba awalnya. Jumlah yang ditambahkan adalah sebanyak 1 mL untuk metode simpleks dan total 1 mL untuk metode multipleks dari masing-masing serovar pengenceran  $10^{-9}$  dan  $10^{-10}$  yang jumlahnya dikonfirmasi dengan metode MPN 3 tabung. Jumlah awal setelah dikonfirmasi ke dalam Tabel *Most Probable Number* (MPN) mencapai 0,9-2,3 MPN/mL. Semua sampel kemudian ditambahkan media BPW (Oxoid) sebanyak 225 mL.

### Evaluasi sensitivitas deteksi teknik *pre-enrichment* (Myint *et al.*, 2006)

Evaluasi sensitivitas deteksi dilakukan dengan: 1) melakukan kontaminasi artifisial, 2) inkubasi selama 8 jam pada 35°C, dan 3) ekstraksi DNA dari 225 mL larutan BPW pada sampel daging ayam terkontaminasi artifisial yang telah. Waktu inkubasi 8 jam mengacu pada penelitian Myint *et al.* (2006), tidak dilakukan optimasi penggunaan waktu inkubasi. Kontaminasi artifisial kultur *Salmonella* dilakukan dengan merujuk pada Myint *et al.* (2006), yaitu dengan menggunakan 25 g sampel daging ayam, kemudian didekontaminasi dengan cara dimasukkan ke dalam plastik steril dan dicelupkan ke dalam air mendidih selama 30 detik dan segera didinginkan pada air es. Daging ayam yang telah didekontaminasi sederhana tersebut dilumuri (*di-spike*) dengan 1 mL kultur yang telah disiapkan (konsentrasi 0,9-2,3 MPN/mL), sehingga diperkirakan cemaran 0,9-2,3 MPN/25 g.

### Ekstraksi DNA (Reyes-Escogido *et al.*, 2010; Nurjanah *et al.*, 2017)

DNA diekstraksi menggunakan metode Chelex-100 dengan modifikasi pada waktu pemanasan. Larutan BPW pada sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 50 mL dan disentrifugasi (kecepatan 805 xg, suhu 4°C, selama 15 menit). Supernatan yang ada sebagian dibuang dan sebanyak 2 mL sel bakteri yang mengendap (pelet) dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 2 mL dan disentrifugasi kembali menggunakan *microcentrifuge* (Hettich Mikro 22R, DJB LabCare, UK) (kecepatan 6000 xg, suhu 4 °C, selama 5 menit). Supernatan kembali dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1000 µL TE *buffer* (10 mM TRIS-base (Sigma-Aldrich) pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0), lalu divortex

hingga homogen. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi (kecepatan 8000 rpm, suhu 4°C, selama 5 menit). Pelet yang dihasilkan di-resuspensi dengan 100 µL TES *buffer* lisis (10 mM TRIS-base (Sigma-Aldrich) pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0.5% SDS), lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan dengan segera 150 µg proteinase-K dan 20 µL RNase. Setelah itu, campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit kemudian pada suhu ruang selama 2 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan 150 µL campuran 25 mg Chelex-100 dalam *buffer* TE. Campuran diinkubasi kembali (suhu 65°C, selama 5 menit), kemudian disentrifugasi (kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 5 menit). Lapisan bagian atas diambil secara perlahan dengan mengukur volumenya untuk dipresipitasi dengan sodium asetat 3M sebanyak 0,1 x volume yang diambil dan etanol 95% sebanyak 2,5 x volume yang diambil, kemudian campuran diinkubasi pada suhu -20°C selama 20 jam. Setelah itu, DNA disentrifugasi (kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit). Pelet yang dihasilkan ditambahkan 500-1000 µL etanol 70%, lalu disentrifugasi kembali (kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit). Supernatan dibuang dan pelet yang dihasilkan dikeringkan pada suhu ruang, lalu dilarutkan dalam 50-100 µL *Nuclease Free Water* (NFW) (Promega no. katalog P1195). Campuran disimpan sebagai DNA *template* pada suhu -20°C sampai digunakan untuk analisis dengan PCR.

### Simpleks dan multipleks PCR

Simpleks dengan primer *InvA* (Soumet *et al.*, 1999), *prot6E* (Hadjinicolaou *et al.*, 2009) dan *STM4497* (Park *et al.*, 2009) masing-masing pada PCR terpisah *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Enteritidis dan *Salmonella* Typhimurium seperti tertera dalam Tabel 1, dan multipleks dilakukan dengan campuran tiga primer pada satu tabung PCR, dengan konsentrasi yang berbeda (Tabel 1). Kondisi running PCR (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System, USA) adalah pra-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi-*annealing*-ekstensi selama 30 siklus dengan suhu dan waktu yang tertera pada Tabel 1, dan diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit, dengan menggunakan PCR GoTaq Green Master Mix (GeneAid) yang terdiri dari Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub>, dan dNTP (masing-masing dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), *Nuclease Free Water* (NFW).

### Aplikasi metode untuk analisis sampel karkas ayam ras (Myint *et al.*, 2006)

Deteksi cemaran *Salmonella* spp. dilakukan pada karkas ayam ras yang diperoleh dari swalayan dan pasar tradisional, dengan jumlah sampel simpleks (n= 12) dan multipleks (n= 9).

Tabel 1. Kondisi *running* PCR pada metode simpleks dan multipleks

	Simpleks PCR <sup>1</sup>			Multipleks PCR <sup>2</sup>		
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Suhu denaturasi (°C)	95	95	95	95	95	95
Ta (°C)	58	52 <sup>1</sup>	52 <sup>1</sup>	58	52 <sup>2</sup>	52 <sup>2</sup>
Suhu ekstensi (°C)	72	72	72	72	72	72
Target gen	InvA	Prot6E	STM4497	InvA	Prot6E	STM4497
Primer	ST11-f ST15-r	438-f 572-r	STM4497M2-f STM4497M2-r	ST11-f ST15-r	438-f 572-r	STM4497M2-f STM4497M2-r
Ukuran (bp)	429	135	311	492	135	311
Konsentrasi primer (µM)		0,500		0,400	0,400	0,120

Keterangan: <sup>1</sup> = Yosua (2018); <sup>2</sup> = Asthiti (2019)

Karkas ayam utuh dimasukkan ke dalam plastik steril, direndam dengan 450 mL BPW, dan didiamkan selama 3-5 menit. Seluruh BPW kemudian dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge* 50 mL. Sebanyak 225 mL BPW dalam tabung *centrifuge* 50 mL diinkubasi pada 35°C selama 8 jam sebagai perlakuan dengan *pre-enrichment*, sementara 225 mL BPW lainnya langsung dilakukan ekstraksi DNA dengan langkah awal disentrifugasi (kecepatan 3000 rpm, suhu 4°C, selama 15 menit). Selanjutnya, sebagian supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan disisakan 0,5-1,0 mL, lalu dipindahkan dan digabungkan dengan hasil sentrifugasi dari tabung lain ke dalam tabung *microcentrifuge* 2 mL. Ekstraksi DNA dilakukan terhadap larutan dengan metode Chelex-100, lalu hasil ekstraksi DNA dianalisis dengan PCR (Applied Biosystem), Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel (Bio-Rad) menggunakan agarosa 2% dan pita DNA divisualisasi melalui Geldoc (Bio-Rad).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sensitivitas metode simpleks

Karkas ayam yang digunakan dalam penelitian ini mungkin mengandung *Salmonella*, sehingga dalam mengevaluasi sensitivitas metode dalam mendeteksi *Salmonella* perlu dihilangkan mikroba tersebut. Adanya mikroba *indigenous* pada permukaan sampel ayam dapat mengganggu cemaran artifisial yang diinokulasikan secara sengaja sehingga dapat mengganggu proses *recovery* dalam media *enrichment* (Matias *et al.*, 2010). Berdasarkan hal tersebut, pada pengujian dengan menggunakan kontaminasi artifisial perlu dilakukan tahap dekontaminasi dan dievaluasi efektivitasnya. Proses dekontaminasi yang dilakukan terhadap sampel karkas ayam dengan pemberian air mendidih (100°C) selama 30 detik dilanjutkan *cold shock* pada air es telah efektif menghilangkan bakteri *indigenous* dari karkas ayam (Data tidak ditampilkan).

Primer telah diuji spesifisitasnya pada penelitian sebelumnya dengan melakukan analisis terhadap sekuen parsial gen yang dihasilkan dan di-

konfirmasi dengan sekuen referensi pada *GenBank* (Wulan *et al.*, 2021). Primer tersebut telah merujuk dengan tepat pada serovar *Salmonella* target, sehingga dalam penelitian ini tidak lagi dikonfirmasi dengan uji serologi.

Konsentrasi *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* dan *S. Typhimurium* dipersiapkan serendah mungkin dengan melakukan pengenceran (sepersepuluh) secara bertahap sampai 9 dan 10 kali pengenceran. Perhitungan dengan metode MPN 3 seri tabung dilakukan agar mampu mendeteksi jumlah yang rendah dan konversi dalam Tabel MPN menunjukkan jumlah awal *Salmonella* spp. dan *S. Enteritidis* dengan jumlah 2,3 MPN/mL dan *S. Typhimurium* dengan jumlah 0,9 MPN/mL, yang kemudian *dispike* ke dalam 25 g daging ayam. Setelah dilakukan simpleks PCR, ketiga serovar *Salmonella* dengan konsentrasi tersebut menunjukkan pita elektroforesis dengan ampikon yang sesuai gen target masing-masing, yaitu 429 bp (*Salmonella* Hadar, yang mewakili genus *Salmonella* spp.), 135 bp (*S. Enteritidis*) dan 311 bp (*S. Typhimurium*) (Gambar 1). Pita spesifik yang baik yaitu terlihat tebal, ukuran yang sesuai target, tidak ada pembentukan primer dimer dan tidak *smear* (Maksum *et al.*, 2018).

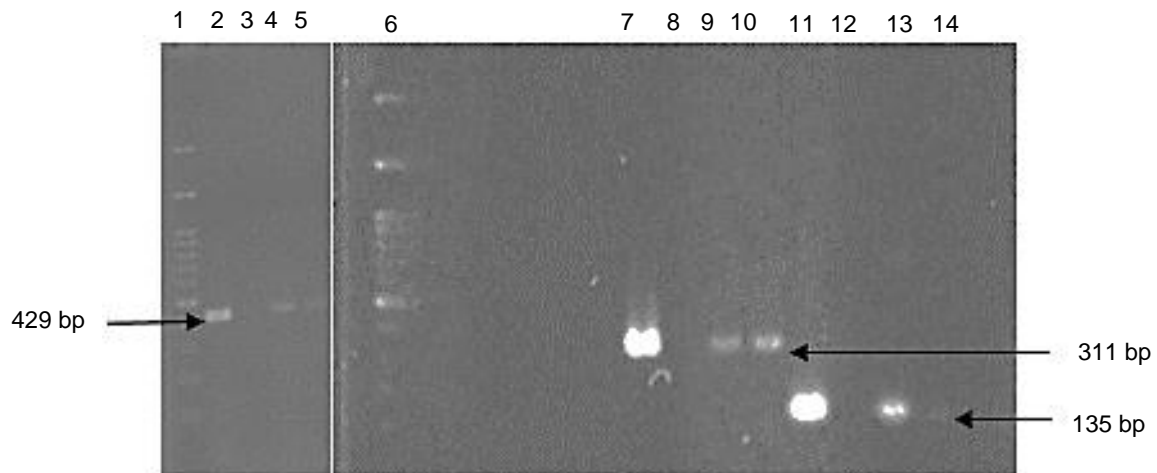
Tahap *pre-enrichment* di media BPW selama 8 jam pada suhu 35°C efektif untuk mendeteksi cemaran *Salmonella* spp. pada jumlah yang sangat rendah melalui metode simpleks PCR, dibandingkan dengan penelitian Yosua (2018) yang mampu mendeteksi pada limit 10<sup>3</sup> CFU/g. Hasil tersebut senada dengan penelitian yang dilakukan Krämer *et al.* (2011) yang menunjukkan limit deteksi *Salmonella* spp. 1,4 CFU/10 g menggunakan metode PCR dengan tahap *pre-enrichment* 8 jam.

### Sensitivitas metode multipleks

Senada dengan hasil simpleks *pre-enrichment*-PCR, multipleks *pre-enrichment*-PCR juga menunjukkan sensitivitas yang tinggi atau mampu mendeteksi campuran ketiga serovar dengan jumlah sangat rendah. Hasil perhitungan MPN yang dilakukan untuk konfirmasi jumlah bakteri dari campuran 3 serovar kultur *Salmonella* dan *dispike* ke dalam 25 g karkas ayam (sekitar 0,73 MPN/25 g)

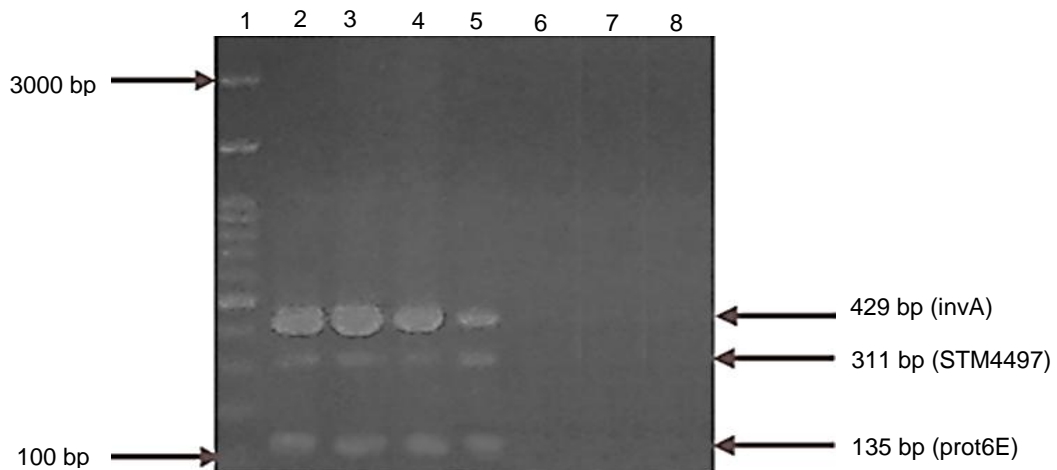
yang menunjukkan jumlah sel awal yang sangat rendah. Setelah dilakukan multipleks PCR, hasil elektroforesis pada *line* yang sama menunjukkan kombinasi ukuran pita yang sesuai gen target masing-masing, yaitu 429 bp (*Salmonella* Hadar, yang mewakili genus *Salmonella* spp.), 135 bp (*S. Enteritidis*) dan 311 bp (*S. Typhimurium*) (Gambar 2). Tahapan *pre-enrichment* selama 8 jam menunjukkan hasil

positif atau dapat terdeteksi pada ketiga jenis target gen (Gambar 2). Oleh karena itu, pada sampel daging ayam yang diduga memiliki cemaran dalam jumlah sangat rendah, tahapan *pre-enrichment* pada suhu 35°C selama 8 jam sebelum deteksi menggunakan multipleks PCR harus dilakukan terlebih dahulu.



Keterangan: line 1,6= ladder 1200 bp; 2-5= primer InvA, bakteri *S. Hadar*, perkiraan konsentrasi bakteri ( $10^9$  CFU/25 g, tanpa bakteri, 10 CFU/25 g, 1 CFU/25 g); 7-10= primer STM4497, bakteri *S. Typhimurium*, perkiraan konsentrasi bakteri ( $10^9$  CFU/25 g, tanpa bakteri, 10 CFU/25 g, 1 CFU/25 g); 11-14= primer Prot6E, bakteri *S. Enteritidis*, perkiraan konsentrasi bakteri ( $10^9$  CFU/25 g, tanpa bakteri, 10 CFU/25 g, 1 CFU/25 g)

Gambar 1. Visualisasi DNA menggunakan gel elektroforesis hasil uji evaluasi sensitivitas deteksi *Salmonella* spp. dengan metode simpleks PCR



Keterangan: line 1 DNA ladder; 2-5 sampel dengan kontaminasi artifisial perkiraan konsentrasi bakteri 1 CFU/25 g dengan ulangan; 6-8 sampel tanpa kontaminasi artifisial

Gambar 2. Hasil amplifikasi multipleks PCR pada daging ayam yang dikontaminasi artifisial dengan jumlah total *Salmonella* sangat rendah

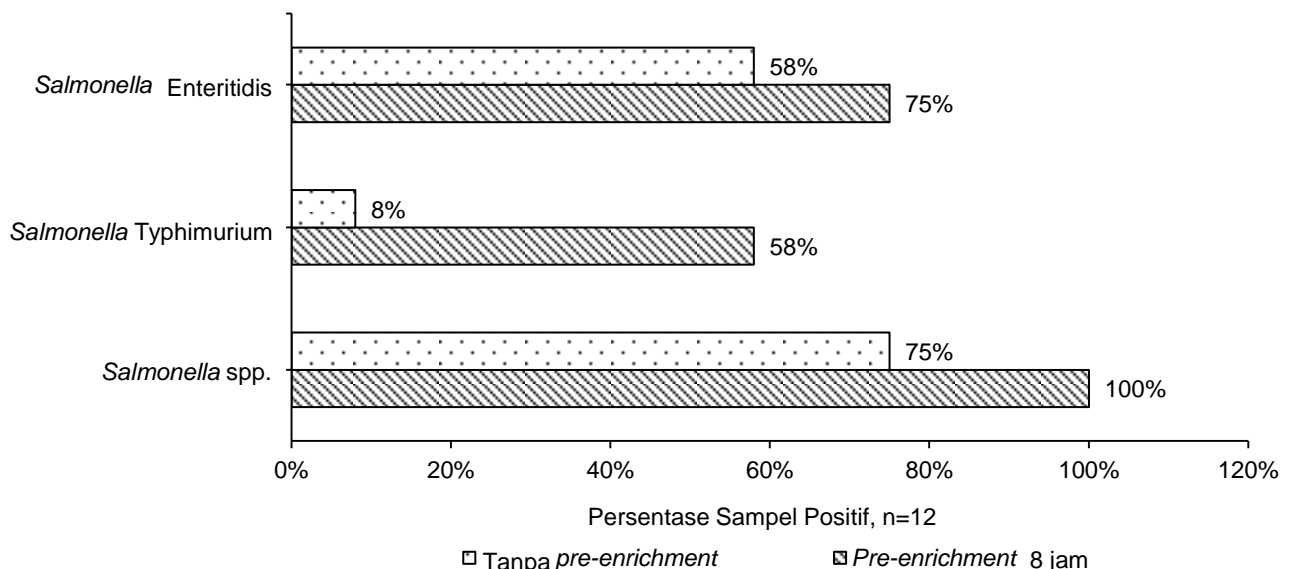
Metode multipleks PCR dapat dipengaruhi oleh beberapa parameter selama analisis termasuk kombinasi primer spesifik dari serovar yang ingin diidentifikasi secara bersamaan, diperlukan desain primer dengan karakteristik kondisi *running* yang mendekati kondisi primer lainnya yang sudah diketahui (Chiang *et al.*, 2018). Protokol multipleks harus dioptimasi untuk setiap kombinasi gen target, belum ada protokol baku dalam prinsip kerja PCR yang dapat digunakan untuk setiap kondisi terutama dalam metode multipleks PCR (Liu *et al.*, 2012). Kombinasi konsentrasi primer yang digunakan untuk target gen *invA* sebesar 0,400  $\mu\text{M}$ , *Prot6E* sebesar 0,400  $\mu\text{M}$  dan *STM4497* sebesar 0,120  $\mu\text{M}$  telah diuji sebelumnya dengan menggunakan *template* DNA yang berasal dari kultur murni *Salmonella* serovar dan menghasilkan 3 pita yang spesifik.

### Peningkatan presentase hasil positif metode *pre-enrichment* untuk deteksi *Salmonella* spp. pada karkas ayam

Karkas ayam ras digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini, karena jumlah produksi dan konsumsi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ayam kampung. Kontaminasi *Salmonella* spp. pada karkas ayam ras dapat terjadi akibat adanya kontaminasi oleh mikroorganisme sebelum ayam dipotong (pencemaran primer) dan sesudah ayam dipotong (pencemaran sekunder) (Aerita *et al.*, 2014). Penjualan ayam dianggap sebagai sumber utama kontaminasi *Salmonella* spp. pada karkas dan kondisi penanganan yang tidak terkontrol de-

ngan baik terutama saat karkas ayam dijual dapat menyebabkan meningkatnya jumlah *Salmonella* spp. yang telah ada sebelumnya (Hoelzer, 2011; El-Sharkawy *et al.*, 2017).

Penggunaan metode PCR dengan *pre-enrichment* dibandingkan dengan tanpa *enrichment* dilakukan untuk menganalisis sampel karkas ayam yang sama. Kedua metode ini menunjukkan hasil persentase positif cemaran *Salmonella* spp. yang berbeda (Gambar 3). Dibandingkan dengan tanpa *enrichment*, simpleks *pre-enrichment*-PCR memberikan peningkatan persentase hasil positif. Secara rinci, uji coba metode simpleks pada karkas ayam ( $n=12$ ) tanpa *enrichment* dan penggunaan *pre-enrichment* masing-masing memberikan hasil positif *Salmonella* spp., 9 (75%) dan 12 (100%), positif *S. Typhimurium* 1 (8%) dan 7 (58%), dan positif *S. Enteritidis* 7 (58%) dan 9 (75%) (Gambar 3). Peningkatan persentase positif juga terjadi pada hasil multipleks *pre-enrichment*-PCR. Uji coba metode multipleks pada karkas ayam ( $n=9$ ) tanpa *enrichment* dan penggunaan *pre-enrichment* masing-masing memberikan hasil positif *Salmonella* spp., 7 (77%) dan 9 (100%) dan positif *S. Typhimurium* 1 (11%) dan 5 (56%). Namun kondisi multipleks yang diaplikasikan di dalam sampel dengan kontaminan alami belum menunjukkan kemampuan mendeteksi *S. Enteritidis* secara optimum, diduga karena konsentrasi *S. Enteritidis* di dalam sampel tersebut terlalu rendah, sehingga primer sulit mencapai targetnya.



Gambar 3. Perbandingan hasil positif dengan *pre-enrichment* 8 jam dan tanpa *pre-enrichment* simpleks PCR deteksi kontaminasi *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, dan *S. Enteritidis* pada karkas ayam

Secara umum, penggunaan tahap *pre-enrichment* dapat mengurangi false negatif baik pada simpleks maupun menggunakan multipleks. Penggunaan multipleks PCR memberi keuntungan cepatnya hasil deteksi serovar yang berbeda di antara campuran kontaminan *Salmonella*, tetapi memberikan persentase hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan simpleks PCR. Berdasarkan penelitian Gandra *et al.* (2016), metode multipleks PCR menurunkan sensitivitas deteksi dibandingkan dengan metode simpleks PCR, karena pada multipleks PCR dapat terjadi kompetisi amplifikasi antara satu target gen dengan target gen lainnya sehingga amplifikasi tidak dapat berjalan dengan baik.

Pengujian menggunakan metode multipleks PCR dengan tahap *pre-enrichment* dapat membantu mendeteksi *Salmonella* spp., *S. Typhimurium* dan *S. Enteritidis* dalam jumlah awal yang sangat rendah. Efektifitas metode *enrichment* dapat ditingkatkan dengan menggunakan medium yang dapat mengeliminasi bakteri Gram negatif lainnya yang masih dapat tumbuh pada media BPW. Keberadaan bakteri Gram negatif lainnya dapat memengaruhi reaksi PCR dan visualisasi pada gel elektroforesis, salah satunya dalam membentuk *background* pita atau *smear* (Tran *et al.*, 2013). Kombinasi media dalam tahap *enrichment* juga direkomendasikan untuk memastikan isolasi berbagai jenis strain dari sampel dengan matriks yang kompleks (Gorsk, 2012).

## KESIMPULAN

*Salmonella* spp. dengan jumlah rendah (<3 CFU/25 g) yang diberi perlakuan *pre-enrichment* dalam media BPW selama 8 jam mampu dideteksi dengan metode PCR. Tahap *pre-enrichment* penting dilakukan dalam upaya mengurangi kesalahan negatif. Aplikasi metode PCR dengan penambahan tahap *pre-enrichment* menunjukkan peningkatan hasil positif kontaminasi *Salmonella* spp.. Dibandingkan dengan tanpa *enrichment*, simpleks *pre-enrichment*-PCR memberikan peningkatan persentase hasil positif *Salmonella* spp., dari 75 menjadi 100%, positif *S. Typhimurium* dari 8 menjadi 58%, dan positif *S. Enteritidis* dari 58 menjadi 75%. Pada multipleks PCR, penggunaan *pre-enrichment* memberikan peningkatan hasil positif *Salmonella* spp., dari 77 menjadi 100% dan hasil positif *S. Typhimurium* dari 11 menjadi 56%. Namun kondisi multipleks yang dilakukan dalam penelitian ini belum optimum untuk mendeteksi *S. Enteritidis* ketika diaplikasikan ke dalam sampel karkas ayam.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tim Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia atas pembiayaan penelitian dalam skema hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) tahun 2019.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aerita AN, Pawenang ET, Mardiana. 2014. Hubungan higiene pedagang dan sanitasi dengan kontaminasi *Salmonella* pada daging ayam potong. *Unnes J Public Health* 3: 9-16.
- Afendy ATM, Son R. 2015. Pre-enrichment effect on PCR detection of *Salmonella* Enteritidis in artificially-contaminated raw chicken meat. *Int Food Res J* 22: 2571-2576.
- Asthiti NGAM. 2019. Peningkatan Sensitivitas Deteksi Cemarannya *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, dan *S. Enteritidis* menggunakan Multiplex PCR dengan Tahap Pre-enrichment. [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Bakara VFS, Tafsir M, Hasnudi. 2014. Analisis bakteri *Salmonella* spp. pada daging ayam potong yang dipasarkan pada pasar tradisional dan pasar modern di Kota Medan. *J Peternakan Integratif* 3: 71-83. DOI: 10.32734/jpi.v3i1.2746.
- Chiang Y-C, Wang H-H, Ramireddy L, Chen H-Y, Shih, C-M, Lin C-K, Tsen H-Y. 2018. Designing a biochip following multiplex polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* serovars Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Hadar, and Virchow in poultry products. *J Food Drug Anal* 26: 58-66. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.11.019.
- Crump JA, Wain J. 2017. *Salmonella*. *International Encyclopedia of Public Health* 2: 425-433. DOI: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00394-5.
- El-Sharkawy H, Tahoun A, El-Gohary AEGA, El-Abasy M, El-Khayat F, Gillespie T, Kitade Y, Hafez HM, Neubar H, El-Adawy H. 2017. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathog* 9: 1-12. DOI: 10.1186/s13099-017-0157-1.
- Eng S-K, Pusparajah P, Ab-Mutalib N-S, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8: 284-293. DOI: 10.1080/21553769.2015.1051243.

- Gandra EA, Fernandez MA, Silva JA, da Silva WP. 2016. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. *Ciênc Rural* 46: 1418-1423. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151391.
- Gorski L. 2012. Selective enrichment media bias the types of *Salmonella enterica* strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths. *PLoS ONE* 7: 1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0034722.
- Hadjinicolaou A, Dmetriou VL, Emmanuel MA, Kakiyiannis CK, Kostrikis LG. 2009. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiol* 9: 1-14. DOI: 10.1186/1471-2180-9-97.
- Hoelzer K, Switt AIM, Wiedmann M. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res* 42: 1-28. DOI: 10.1186/1297-9716-42-34.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2017. ISO 6579:1 Detection of *Salmonella* spp.. Switzerland (CH): ISO.
- [Kementan RI] Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2020. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2020. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Jakarta.
- Krämer N, Löfström C, Vigre H, Hoorfar J, Bunge C, Malorny B. 2011. A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: Combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses. *Int J Food Microbiol* 145: 86-96. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.026.
- Liu B, Zhou X, Zhang L, Liu W, Dan X, Shi C, Shi X. 2012. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* 27: 87-93. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.01.062.
- Maciel BM, Dias JCT, Romano CC, Sriranganathan N, Brendel M, Rezende RP. 2011. Detection of *Salmonella* Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. *Genet Mol Res* 10: 2578-2588.
- Maksum IP, Suhaili, Amalia R, Kamara DS, Rachman SD, Rachman RW. 2018. PCR Multiplex untuk identifikasi *Mycobacterium tuberculosis* resisten terhadap isoniazid dan rifampisin pada galur lokal balai laboratorium kesehatan Provinsi Jawa Barat. *J Kimia Valensi* 4: 107-118. DOI: 10.15408/jkv.v4i2.7226.
- Matias BG, Pinto PSA, Cossi MVC, Silva JA, Vanetti MCD, Nero LA. 2010. Evaluation of a PCR protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and pre-enrichment broth. *Poultry Sci* 89: 1524-1529. DOI: 10.3382/ps.2009-00368.
- Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. 2006. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol* 23: 599-604. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.002
- Nurjanah S, Rahayu WP, Komalasari E. 2017. Sensitivity of multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *E. coli* on ice sample. November 14-17 2017. Ho Chi Minh City, Vietnam. Ho Chi Minh City (VI): Proceedings of the 15th ASEAN Conference on Food Science and Technology.
- Nurjanah S, Rahayu WP, Mutaqin LA. 2018. Detection method for *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis using real-time polymerase chain reaction. *Int J Eng Technol* 7: 302-306. DOI: 10.14419/ijet.v7i4.14.27661.
- Park SH, Kim HJ, Cho WH, Kim JH, Oh MH, Kim SH, Lee BK, Ricke SC, Kim HY. 2009. Identification of *Salmonella enterica* subspecies I, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. *FEMS Microbiol Lett* 30: 137-146. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01809.x.
- Radji M, Puspaningrum A, Sumiati A. 2010. Deteksi cepat bakteri *Escherichia coli* dalam sampel air dengan metode polymerase chain reaction menggunakan primer 16e1 dan 16e2. *Makara J Sci* 14: 39-43. DOI: 10.7454/mss.v14i1.474.
- Reyes-Escogido L, Balam-Chi M, Rodriguez-Buenfil I, Valdés J, Kameyama L, Martinez-Pérez F. 2010. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 mins using chelex-100 microwave: examples from stains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Anton Leeuw* 98: 465-474. DOI: 10.1007/s10482-010-9462-0.
- Saeki EK, Alves J, Bonfante RC, Hirooka EY, de Oliveira TCRM. 2012. Multiplex PCR (mPCR) for detection of *Salmonella* spp. and the differentiation of Typhimurium and Enteritidis serovars in chicken meat. *J Food Safety* 33: 25-29. DOI: 10.1111/jfs.12019.
- Safitri E, Hidayati NA, Hertati R. 2019. Prevalensi bakteri *Salmonella* pada ayam potong yang dijual di pasar tradisional pangkalpinang. *Ekotomia: J Penelitian Biologi, Botani, Zoologi,*



- dan Mikrobiologi 4: 25-30. DOI: 10.33019/ekotonia.v4i1.1012.
- Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. 1999. Evaluation of multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 28: 113-117. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00488.x.
- Taskila S, Tuomola M, Ojamo H. 2012. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food Control* 26: 369-377. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.01.043.
- Tortajada-Genaro LA, Rodrigo A, Hevia E, Mena S, Niñoles R, Maquieira Á. 2015. Microarray on digital versatile disc for identification and genotyping of *Salmonella* and *Campylobacter* in meat products. *Anal Bioanal Chem* 407: 7285-7294. DOI: 10.1007/s00216-015-8890-0
- Tran HH, Trinh KTL, Lee NY. 2013. Pressure-driven one-step solid phase-based on-chip sample preparation on a microfabricated plastic device and integration with flow-through polymerase chain reaction (PCR). *J Chromatogr B* 936: 88-94. DOI: 10.1016/j.chromb.2013.06.037.
- Triyani Y, Nafsi N, Yuniarti L, Sekarwana N, Sutedia E, Gurnida DA, Parwati I, Alisjahbana B. 2016. Rancangan primer spesifik gen macrophage mannose receptor (MMR) untuk Polymerase Chain Reaction (PCR) dan sekuensing Deoxyribose Nucleic Acid (DNA). *Indonesian J Clin Pathol Med Lab* 22: 158-162. DOI: 10.24293/ijcpml.v22i2.1120.
- Utari LK, Riyanti, Santosa PE. 2016. Status mikrobiologis daging broiler di pasar tradisional kabupaten Pringsewu. *J Ilmiah Peternakan Terpadu* 4: 63-66.
- Wulan HA, Nurjanah S, Rahayu, WP. 2021. Sensitivity of enrichment-PCR method for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis analysis in chicken carcasses. *Food Res* 5: 54-61. DOI: 10.26656/fr.2017.5(2).429.
- Yosua A. 2018. Deteksi *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Typhimurium, dan *Salmonella* Enteritidis menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- [WHO] World Health Organization. 2014. WHO Global Salmonella survey: Progress Report 2008-2013. World Health Organization.