

## Desain Primer Gen Virulensi *invA* untuk Identifikasi dan Sekuensing *Salmonella* pada Sampel Karkas Ayam

*Primary Design of invA Virulence Gene for Identification and Sequencing of Salmonella in Chicken Carcass Samples*

R. P. Melati<sup>1</sup>, S. Nurjanah<sup>1,2\*</sup>, & W. P. Rahayu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>*Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFAST) Center,*

Institut Pertanian Bogor

Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Indonesia

\*Corresponding author: [sity\\_nr@apps.ipb.ac.id](mailto:sity_nr@apps.ipb.ac.id)

(Received 03-02-2022; Revised 09-03-2022; Accepted 31-03-2022)

### ABSTRACT

Identification and sequencing of *Salmonella* require a specific primer as well as a virulence marker. Invasion gene (*invA*) is a gene found in all types of *Salmonella*, specific to *Salmonella*, and has a low mutation rate so that it can be used as a target gene for *Salmonella* identification. This study aimed to design a primer of *invA* gene of *Salmonella* spp. with long amplicons, has broad serovar coverage, and get an optimum PCR condition. Primers were designed and checked its specificity in silico using Primer-BLAST and then selected. Selected primer was evaluated for annealing temperature and primer concentration. Based on the sequential selection, it was obtained a set of *invA* gene primer with forwarding sequences GCCGGTGAAATTATCGCCAC (started at base 297) and reverse sequences CTCGTAATTCGCCGCCATTG (started at base 1763). Based on Primer-BLAST analysis, the primer gave an amplicon size of 1486 bp, has annealing temperature of 58 °C, capable of detecting at least 110 *Salmonella* serovars, capable to detect *Salmonella* contamination in chickens, and unable to detect the presence of *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Hafnia* sp., and *E. coli*. This primer can detect *Salmonella* very well with annealing temperature of 58 °C and primer concentration of 1.2 µM.

**Keywords:** chicken, *invA*, PCR, primer, *Salmonella*

### ABSTRAK

Identifikasi dan sekuensing *Salmonella* memerlukan primer spesifik dan sekaligus sebagai penanda virulensi. Gen invasi (*invA*) merupakan gen yang terdapat pada semua jenis *Salmonella*, spesifik terhadap *Salmonella*, serta memiliki laju mutasi yang rendah sehingga dapat dijadikan gen target untuk identifikasi *Salmonella*. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer gen *invA* *Salmonella* spp. dengan amplicon panjang, mempunyai coverage serovar yang luas serta mendapatkan kondisi PCR optimal. Primer didesain, dicek spesifisitasnya secara in silico menggunakan program Primer-BLAST serta diseleksi. Primer terpilih dievaluasi suhu *annealing* dan konsentrasi primer. Berdasarkan seleksi bertahap diperoleh 1 pasang primer spesifik gen *invA*, dengan urutan basa *forward* GCCGGTGAAATTATCGCCAC (dimulai pada basa ke-297) dan urutan basa *reverse* CTCGTAATTCGCCGCCATTG (dimulai pada basa ke-1763). Berdasarkan hasil Primer-BLAST, primer tersebut memberikan ukuran amplicon sebesar 1486 bp, memiliki suhu *annealing* 58 °C, mampu mendeteksi setidaknya 110 serovar *Salmonella*, mampu mendeteksi cemaran *Salmonella* pada ayam, serta tidak dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Hafnia* sp., dan *E. coli*. Primer tersebut dapat mendeteksi *Salmonella* dengan baik pada suhu *annealing* 58 °C dan konsentrasi primer sebesar 1.2 µM.

**Kata kunci:** ayam, *invA*, PCR, primer, *Salmonella*

## PENDAHULUAN

Daging ayam merupakan sumber protein hewani yang paling banyak dikonsumsi di Indonesia (Kementan 2020). Salah satu cemaran patogen yang sering ditemukan pada karkas ayam adalah *Salmonella* spp. Cemaran *Salmonella* yang berasal dari ayam mampu menyebabkan Non-Typhoidal Salmonellosis (NTS) pada manusia (Eng *et al.* 2015). Menurut CDC (2021), *Salmonella* diestimasi menyebabkan 1.350.000 kasus infeksi, 26.500 orang dirawat di rumah sakit, dan 420 orang meninggal di Amerika Serikat setiap tahunnya. Estimasi biaya akibat penyakit yang disebabkan oleh NTS setiap tahunnya di Amerika Serikat mencapai US\$ 3.309.000. Biaya tersebut mencakup estimasi biaya perawatan, kerugian akibat kematian dini, dan hilangnya produktivitas penderita infeksi. Biaya ini merupakan biaya yang paling tinggi jika dibandingkan dengan biaya akibat infeksi bakteri patogen lainnya (Hoffmann *et al.* 2012).

Identifikasi *Salmonella* pada sampel dapat dilakukan dengan pendekatan molekuler. Pendekatan ini mempercepat perolehan hasil identifikasi serta lebih sensitif sehingga mampu membedakan berbagai jenis *Salmonella* dengan lebih baik. Salah satu teknik yang populer adalah dengan melakukan sekuensing DNA dari isolat *Salmonella* yang berasal dari karkas ayam. Hasil sekuensing isolat *Salmonella* kemudian dapat dibandingkan dengan data sekuen *Salmonella* yang terdapat pada pusat data yang salah satunya adalah *GenBank* pada laman NCBI. Identifikasi dilakukan berdasarkan kesamaan sekuen gen, sehingga apabila terdapat perbedaan gen akibat mutasi, maka hasil identifikasi juga akan berbeda. Untuk dapat mendeteksi sebanyak mungkin mutasi gen yang ada, dibutuhkan sekuen gen yang selengkap mungkin. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan sekuensing *whole genome sequencing* (WGS) (Franco-Duarte *et al.* 2019). Namun WGS membutuhkan biaya yang tinggi dan waktu pengerjaan yang lebih lama. Oleh sebab itu, dipilih sekuen gen tertentu.

Sekuen gen yang umum digunakan untuk identifikasi organisme adalah 16s rRNA dengan panjang sekitar 1500 bp. Namun, sekuen gen ini hanya dapat membedakan dengan baik hingga tingkat spesies. Maka dipilih sekuen gen lain yang terdapat pada semua jenis *Salmonella* namun bersifat spesifik agar gen tersebut dapat mendeteksi berbagai jenis *Salmonella* namun tidak akan mendeteksi gen mikroba lainnya, memiliki laju mutasi yang rendah sehingga tidak terdapat kesalahan homoplas akibat adanya pergantian gen kembali (contohnya basa nukleotida A yang berubah menjadi T kemudian berubah kembali menjadi A), serta umum digunakan sehingga telah banyak data yang tersedia tentang gen tersebut di pusat data. Gen yang memenuhi kriteria tersebut adalah gen *invA* (Lilic *et al.* 2010). Namun, ketersediaan primer dengan target gen *invA* dengan ampikon panjang (lebih dari 1000 bp, seperti 16S rRNA) dengan spesifikasi yang baik sulit ditemukan. Oleh karena itu dibutuhkan desain primer baru dengan spesifikasi yang baik dan dapat mengamplifikasi gen *invA* dengan ampikon yang panjang. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer gen *invA Salmonella* spp. dengan ampikon panjang,

mempunyai *coverage* serovar yang luas serta melakukan optimasi kondisi PCR.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Sampel yang digunakan adalah kultur murni *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) dari Laboratorium Mikrobiologi SEAFast Center, IPB Bogor dan isolat *Salmonella* spp. asal karkas ayam.

### Metode

#### Desain Primer dengan Analisis *In Silico*

Sekuen gen yang digunakan untuk mendesain primer didapatkan dari *GenBank* pada laman NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekuen gen yang digunakan sebagai *template* dicari pada *GenBank* dari NCBI dengan kata kunci '*invA*' dan '*Salmonella*'. Sekuen gen *invA* dari *S. Typhimurium* (kode akses M90846.1) dipilih. Primer didesain dan dianalisis menggunakan program Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Primer dicek spesifisitasnya secara *in silico* menggunakan BLAST pada laman NCBI. Pengecekan spesifisitas dilakukan dengan membuka laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, menyalin primer pada kolom '*use my own forward/reverse primer*', kemudian melakukan klik '*Get primer*'. Spesifisitas dicek juga untuk bakteri *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Hafnia* sp., dan *E. coli* yang memiliki tingkat kemiripan sekuen gen yang tinggi dengan sekuen gen *invA* pada *Salmonella* spp. dengan memasukkan nama bakteri-bakteri tersebut pada kolom '*Organism*' (Resendiz-Nava *et al.* 2019).

Pengecekan *start* dan *stop point* primer pada target gen dilakukan menggunakan program Primer-BLAST pada laman NCBI. Target gen yang digunakan adalah gen *invA Salmonella* Typhimurium strain Egypt/poultry/2014 (kode akses KR185982.1) yang merupakan sekuen gen yang didapat dari hasil penelitian El-Sebay *et al.* (2017) dan gen *invA Salmonella* Typhimurium (kode akses M90846.1) yang merupakan target gen yang digunakan pada saat mendesain primer. Hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan hasil cek *start* dan *stop point* primer pada target gen yang dilakukan menggunakan primer dari Rahn *et al.* (1992) yang sering dipakai pada penelitian deteksi *Salmonella* menggunakan PCR.

#### Amplifikasi Ekstrak DNA Isolat *Salmonella* dengan *invA*

Sebanyak 1 ose isolat *Salmonella* diinokulasi ke dalam 5 mL BPW kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. DNA sampel kemudian diekstrak menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit dari Geneaid. Seluruh proses sentrifus dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang (30 °C). Sebanyak 2 mL isolat uji yang telah disegarkan dipindahkan ke tabung mikrosentifus 2 mL. Sampel kemudian disiapkan sehingga terjadi lisis pada sel bakteri dengan larutan GT *buffer*, Proteinase K, GB *buffer*, dan RNase A. Setelah itu, proses ekstraksi selanjutnya dibantu dengan membran GD *column*. DNA kemudian dilarutkan dengan larutan etanol absolut sehingga DNA dapat terikat pada membran dan terpisah dengan

kontaminan yang larut etanol yang terikat pada supernatan. Larutan W1 *buffer* dan larutan *wash buffer* ditambahkan untuk memisahkan DNA dengan kontaminan lainnya. Larutan *elution buffer* ditambahkan untuk mengikat DNA. Hasil yang didapat berupa ekstrak DNA yang terdapat pada supernatan hasil pemisahan. Ekstrak DNA diukur kemurnian serta konsentrasinya menggunakan *NanoDrop* di IPB *Culture Collection* (IPBCC).

### Optimasi Kondisi PCR dengan Primer *InvA*

Amplifikasi segmen DNA dari isolat uji dilakukan menggunakan metode PCR. Terdapat dua alat PCR yang digunakan, yakni PCR Eppendorf Mastercycler® X50 untuk optimasi suhu *annealing* primer dan untuk yang selain optimasi suhu *annealing* menggunakan Applied Biosystem Thermal Cycler 2720. Kondisi *running* PCR ditunjukkan pada Tabel 1 dan komposisi reagen yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Kondisi *running* PCR (Wulan *et al.* 2021)

Tahap	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah siklus
Pra denaturasi	95	3	1
Denaturasi	95	1	30
Annealing	55, 55.6, 56.6, 58, 59.4, 60.6, 62, 63.3, 64.3, 65	1	
Ekstensi	72	1.5	
Ekstensi akhir	72	5	1

Tabel 2. Komposisi reagen PCR (Promega 2021)

Reagen	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume (µL)
Master mix	2 x	1 x	15
Primer forward			
- Optimasi suhu <i>annealing</i>	10 µM	0.4 µM	1.2
- Sekuensing	10 µM	1.2 µM	3.6
Primer reverse			
- Optimasi suhu <i>annealing</i>	10 µM	0.4 µM	1.2
- Sekuensing	10 µM	1.2 µM	3.6
Template DNA	*	Min. 50 ng	*
NFW	-	-	*
Total			30

Keterangan: \* = disesuaikan dengan konsentrasi template DNA yang didapatkan

Suhu *annealing* yang digunakan untuk amplifikasi gen *invA* merupakan gradien dari Tm primer ± 5 °C. Komposisi reagen yang digunakan untuk amplifikasi gen *invA* berdasarkan panduan penggunaan PCR GoTaq *Green Master Mix* (Geneaid). Hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan gel elektroforesis. Sebanyak 1 µL hasil amplifikasi yang didapatkan diinjeksikan ke 1.2 %

agarosa (ThermoFischer Scientific) dan dielektroforesis menggunakan set elektroforesis (Bio-Rad) pada tegangan 45 V selama 90 menit. Hasil visualisasi berupa terbentuknya pita tebal pada kisaran 1500 bp (hasil amplifikasi gen *invA*, dilihat dari DNA *ladder*), tidak terdapat pita pada panjang bp lainnya (tidak ada yang teramplifikasi selain *invA* dan/atau produk *invA* tidak terpotong), serta tidak terdapat *primer dimer*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemilihan Primer

Berdasarkan hasil desain primer awal dari laman Primer-BLAST, didapatkan sebanyak 22 buah primer *forward* dan 22 buah primer *reverse* (22 set primer). Pasangan primer tersebut kemudian diseleksi berdasarkan panjang ampikon (lebih dari 1000 bp) agar didapatkan ampikon sepanjang mungkin sehingga perbedaan basa nitrogen semakin terlihat dan hubungan kekerabatan terlihat lebih jelas serta kriteria primer yang baik. Selain itu, primer dipilih berdasarkan perbedaan Tm (kurang dari 1 °C), terdapatnya ujung G atau C, menghindari adanya sekuen berulang dengan jumlah sekuen berulang maksimal 4 (contoh: TCTCTCTC), menghindari sekuen *run* atau maksimal 3 nukleotida (contoh: TAAAAGC), dan *self complementarity* serta *self 3' complementarity* yang mendekati 0 (Arenas & Salazar 2019).

Pemeriksaan spesifisitas dilakukan untuk mengetahui jumlah dan jenis *Salmonella* yang dapat dideteksi menggunakan primer tersebut serta organisme lain yang juga dapat dideteksi oleh primer tersebut. Pengecekan kembali dilakukan karena hasil BLAST terbatas hanya hingga 1000 sekuen, sedangkan jumlah serovar dan strain yang terdapat pada *Salmonella* berjumlah 2654 jenis (Issenhuth-Jeanjean *et al.* 2014). Hal tersebut menyebabkan kecocokan yang lebih rendah dengan bakteri lain dibandingkan dengan *Salmonella*, tidak akan ditampilkan.

Berdasarkan persyaratan tersebut, didapatkan tujuh (7) pasang primer. Ketujuh kandidat primer tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Satu pasang primer dipilih berdasarkan ampikon terpanjang yakni 1486 bp. Primer terdiri dari primer forward yang dimulai pada basa ke-297 dan primer reverse yang dimulai pada basa ke-1763. Primer tersebut memiliki spesifikasi dan spesifisitas yang dapat dilihat masing-masing pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Berdasarkan hasil data pada Tabel 4, diketahui bahwa perbedaan Tm hanya sebesar 0.07, sehingga kemungkinan kedua primer dapat menempel pada target gen pada suhu *annealing* yang sama dengan baik. Perbedaan Tm ini lebih kecil dibandingkan primer yang didesain oleh El-Sebay *et al.* (2017) yang memiliki desain primer dengan panjang ampikon yang lebih panjang (2058 bp). Angka *self complementarity* dan *self 3' complementarity* belum mencapai 0 atau angka yang mendekati 0 sehingga masih terdapat kemungkinan primer membentuk hairpin maupun *primer dimer*. Pengujian lebih lanjut dilakukan untuk mengetahui kemampuan amplifikasi primer pada suhu *annealing* yang sama dan kemampuan primer untuk tetap dapat teramplifikasi dengan baik meskipun memiliki

Tabel 3. Spesifikasi calon kandidat primer

Set	Primer	Panjang	$\Delta T_m$	%GC	Self complementarity	Self 3' complementarity
1	Forward	1486	0.07	55	6	2
	Reverse			55	4	3
2	Forward	1215	0.48	55	3	1
	Reverse			55	4	3
3	Forward	1222	0.56	55	3	2
	Reverse			55	4	3
4	Forward	1109	0.51	55	3	0
	Reverse			55	4	3
5	Forward	1119	0.69	55	4	2
	Reverse			55	4	2
6	Forward	1139	0.76	55	4	2
	Reverse			50	5	3
7	Forward	1149	0.12	55	2	0
	Reverse			50	4	3

Tabel 4. Spesifikasi primer terpilih

Primer	Sekuen	Tm	$\Delta T_m$	%GC	Self Complementarity	Self 3' Complementarity
Forward	GCC GGT GAA ATT ATC GCC AC	59.97	0.07	55	6	2
Reverse	CTC GTA ATT CGC CGC CAT TG	60.04		55	4	2

Tabel 5. Spesifisitas primer terpilih

Spesies	Subspesies	Jenis serovar	Jumlah strain	Keterangan
<i>Salmonella</i>	<i>Enterica</i>	110	1000	Terdapat 54 sekuen yang tidak diketahui serovarinya
<i>Klebsiella</i>	sp.	0	0	
<i>Citrobacter</i>	sp.	0	0	
<i>Serratia</i>	sp.	0	0	
<i>Hafnia</i>	sp.	0	0	
<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	0	0	

kemungkinan terbentuknya hairpin dan primer dimer. Pengujian dilakukan dengan melakukan amplifikasi dengan PCR serta memvisualisasi hasil amplifikasi tersebut dengan gel elektroforesis.

Berdasarkan hasil data pada Tabel 5, diketahui bahwa primer tersebut mampu mendeteksi setidaknya 110 jenis serovar *S. enterica* subsp. *enterica* dan mencakup 19 jenis *Salmonella* yang menjadi penyebab utama kasus salmonellosis di Amerika Serikat (CDC 2016). Berdasarkan data pada Tabel 5, dapat diketahui juga bahwa primer tersebut spesifik terhadap *Salmonella* karena tidak dapat mendeteksi sekuen bakteri yang memiliki kemiripan sekuen DNA yang tinggi dengan *invA* pada *Salmonella* spp.

Primer yang didesain pada penelitian ini lebih panjang dari desain primer yang paling umum digunakan

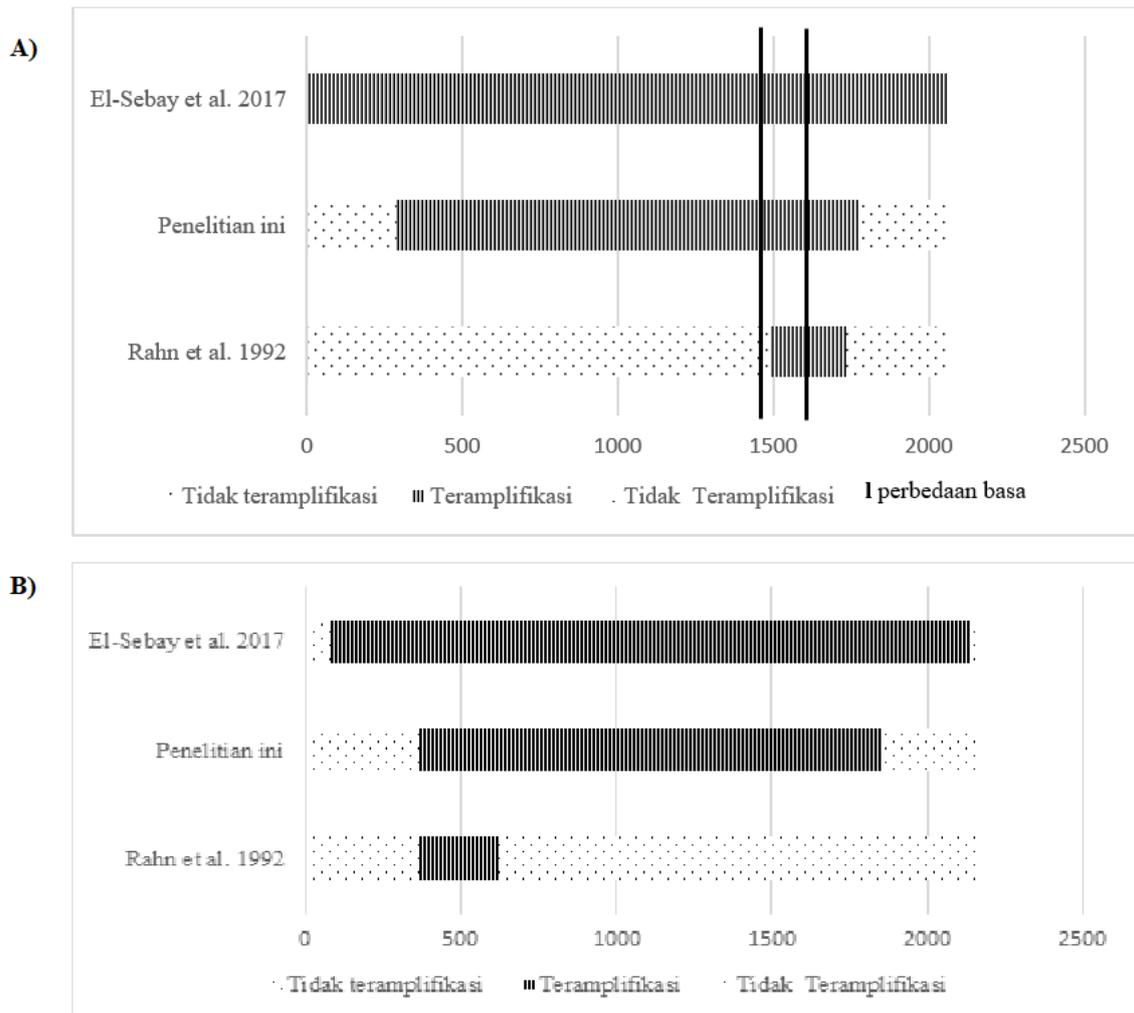
dan memang hanya digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *invA* *Salmonella* (disitasi sebanyak 1158 kali) yaitu 429 bp (Rahn *et al.* 1992). Primer ini lebih pendek dibandingkan primer yang didesain oleh El-Sebay *et al.* (2017), yaitu sepanjang 2058 bp.

Hasil cek *start* dan *stop point* ditunjukkan oleh Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1 tersebut diketahui bahwa primer yang didesain oleh El-Sebay *et al.* (2017) mampu mendeteksi sekuen yang dapat dideteksi dengan primer yang didesain pada penelitian ini dan primer dari Rahn *et al.* (1992). Berdasarkan Gambar 1, primer yang didesain pada penelitian ini mampu mendeteksi sekuen yang dapat dideteksi dengan primer yang didesain Rahn *et al.* (1992). Terdapat bagian dari gen yang dapat dideteksi oleh primer yang didesain oleh El-Sebay *et al.* (2017) namun tidak dapat dideteksi oleh primer yang didesain pada penelitian ini. Namun apabila dibandingkan spesifisitasnya, tidak terdapat perbedaan.

Berdasarkan hasil sekuensing dan analisis sekuen gen pada penelitian yang dilakukan oleh El-Sebay *et al.* (2017), terdapat dua perbedaan basa nukleotida yang dapat mengubah deduksi asam amino pada gen *invA* tersebut. Perbedaan tersebut terdapat pada situs ke-1470 dan 1590 (dapat dilihat pada Gambar 1(A)). Kedua perbedaan tersebut dapat terdeteksi oleh primer yang didesain pada penelitian ini, sedangkan primer yang didesain oleh Rahn *et al.* (1992) hanya dapat mendeteksi salah satu perbedaan basa tersebut.

#### Optimasi Kondisi PCR

Optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan *template* DNA yang berasal dari kultur murni *Salmonella*.



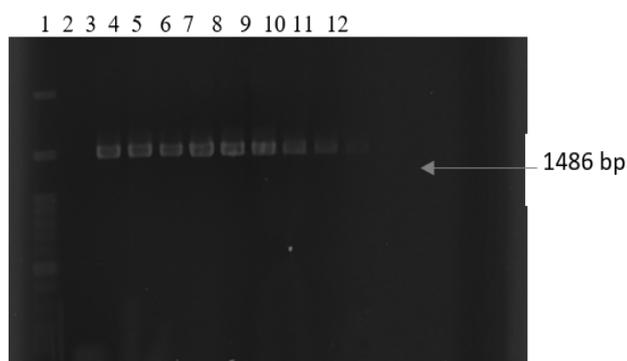
Gambar 1. Perbandingan sekuen gen yang dapat diamplifikasi oleh tiga jenis primer berbeda pada  
 A: gen *invA* dari *Salmonella* Typhimurium strain Egypt/ poultry/2014 (KR185982.1);  
 dan B: gen *invA* dari *Salmonella* Typhimurium (M90846.1)

Hasil optimasi suhu *annealing* untuk primer terpilih dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2, diketahui bahwa amplifikasi dapat terjadi dengan baik pada suhu *annealing* 55-64.3 °C. Hasil tidak menunjukkan pita pada kontrol negatif yang menunjukkan bahwa tidak terjadi kesalahan positif. Pita terlihat paling tebal pada suhu *annealing* 58 °C sehingga suhu tersebut dipilih sebagai suhu *annealing*. Tidak terlihat produk yang terlihat seperti kabut pada panjang di bawah 100 bp yang menunjukkan bahwa gangguan primer dimer akibat interaksi kedua primer pada saat amplifikasi tidak tervisualisasi.

Suhu *annealing* merupakan suhu pada saat primer menempel pada target gen. Primer yang berbeda memiliki kemungkinan untuk memiliki suhu *annealing* yang berbeda sehingga perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* pada primer baru. Suhu *annealing* berkaitan erat dengan Tm. Umumnya suhu *annealing* berkisar antara 5 °C di atas dan di bawah Tm (Arenas & Salazar 2019). Primer memiliki Tm ±60 °C sehingga optimasi suhu *annealing* dilakukan pada suhu antara 55-65 °C.

Hasil optimasi tersebut kemudian diujikan pada ekstrak DNA yang berasal dari isolat uji. Hasil pengujian pada isolat uji menunjukkan hasil amplifikasi DNA tidak dapat tervisualisasi. Hal ini mungkin disebabkan oleh ekstrak dari isolat uji yang mungkin masih mengandung DNA yang berasal bukan dari *Salmonella* serta kemungkinan terdapat zat-zat lain dari sampel yang dapat mengganggu amplifikasi DNA. Kondisi yang kurang efektif dapat menyebabkan sedikitnya jumlah ampikon yang terbentuk sehingga pita tidak dapat terlihat/ terlihat samar pada saat divisualisasi menggunakan gel elektroforesis (Schrader *et al.* 2012).

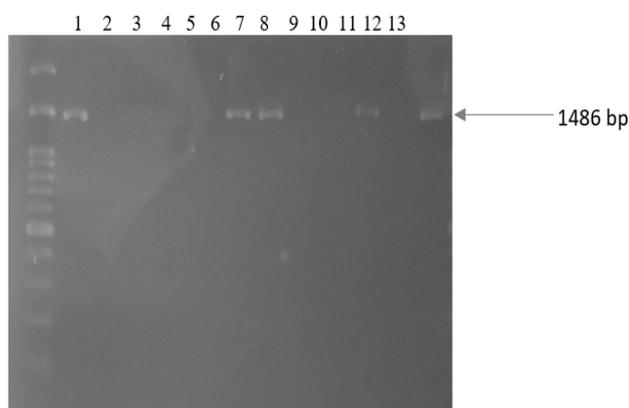
Hal tersebut dapat diselesaikan dengan beberapa langkah yang dapat meningkatkan jumlah ampikon. Langkah-langkah tersebut antara lain mengubah komposisi reagen dan meningkatkan jumlah siklus (untuk proses denaturasi, *annealing*, dan ekstensi). Perubahan komposisi reagen, selain *template* DNA dan primer, membutuhkan pembelian bahan tambahan. Peningkatan *template* DNA dan konsentrasi primer mampu meningkatkan jumlah ampikon karena semakin banyak jumlah *template* DNA dan primer,



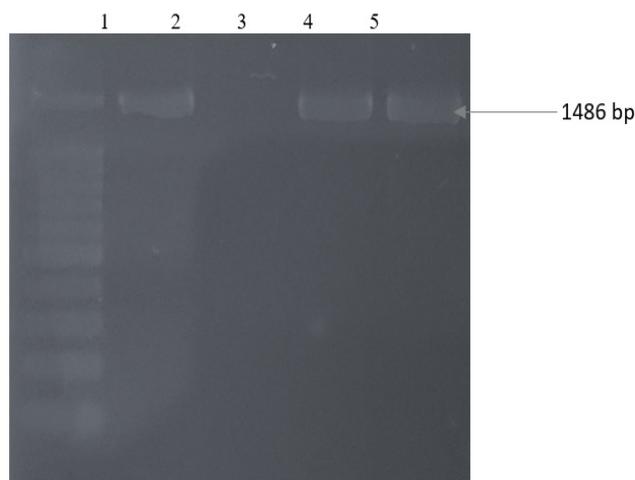
Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis optimasi suhu *annealing* primer line 1: ladder 100 bp; 2: kontrol negatif; 3-12: suhu *annealing* 55, 55.6, 56.6, 58, 59.4, 60.6, 62, 63.3, 64.3, dan 65 °C

semakin besar kemungkinan *template* DNA dan primer tersebut berinteraksi sehingga amplifikasi dapat terjadi. Jumlah *template* DNA yang didapatkan terbatas sehingga langkah optimasi pertama yang dilakukan adalah dengan mengubah konsentrasi primer.

Penggunaan primer dengan konsentrasi 0.8 dan 1  $\mu$ M menghasilkan pita yang tipis (Gambar 3 dan 4), meskipun dilakukan pada jumlah siklus yang tinggi (35 dan 40 siklus). Hasil tersebut kemungkinan dapat mengganggu hasil sekuensing. Gangguan tersebut antara lain tidak adanya sinyal penunjuk basa nukleotida serta sinyal yang terlalu lemah sehingga tidak dapat dibedakan dari noise (Fisher Scientific).



Gambar 3. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis optimasi jumlah siklus line 1: ladder 100 bp; 2: kontrol positif, 35 siklus; 3: kontrol negatif, 35 siklus; 4-5: isolat uji, 35 siklus, konsentrasi DNA 50 ng, konsentrasi primer (0.8, 1.0  $\mu$ M); 6-7: isolat uji, 35 siklus, konsentrasi DNA 100 ng, konsentrasi primer (0.8, 1.0  $\mu$ M); 8: kontrol positif, 40 siklus; 9: kontrol negatif, 40 siklus; 10-11: isolat uji, 40 siklus, konsentrasi DNA 50 ng, konsentrasi primer (0.8, 1.0  $\mu$ M); 12-13: isolat uji, 40 siklus konsentrasi DNA 100 ng, konsentrasi primer (0.8, 1.0  $\mu$ M)



Gambar 4. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan elektroforesis optimasi konsentrasi primer line 1: ladder 100 bp; 2: kontrol positif; 3: kontrol negatif; 4: konsentrasi DNA 50 ng, konsentrasi primer 1.2  $\mu$ M; 5: konsentrasi DNA 100 ng, konsentrasi primer 1.2  $\mu$ M.

Konsentrasi primer optimum terlihat pada Gambar 4, penggunaan konsentrasi primer 1.2  $\mu$ M dengan jumlah siklus sebanyak 30 dapat menghasilkan pita hasil amplifikasi yang tebal dengan konsentrasi *template* DNA paling sedikit 50 ng. Hasil ini tidak terbentuk *multiband* serta *primer dimer* pada hasil amplifikasi.

Penggunaan konsentrasi primer 1.2  $\mu$ M disertai dengan penurunan jumlah siklus menjadi 30 siklus. Penggunaan siklus PCR yang terlalu banyak dapat meningkatkan peluang penempelan primer pada gen non-target yang apabila terakumulasi dapat menyebabkan terbentuknya *multiband* serta adanya *primer dimer* (Innis & Gelfand 2012). Keberadaan pita yang tidak sesuai dapat terbaca pada proses sekuensing dan menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan target gen sehingga mengganggu pembacaan dalam tahap sekuensing. Pita yang tidak sesuai tersebut harus dipisahkan dari pita yang diinginkan untuk disekuensing. Pemisahan pita tersebut memperpanjang dan memperlambat proses sekuensing.

## KESIMPULAN

Hasil seleksi secara bertahap dengan program Primer-BLAST terpilih 1 dari 7 pasang primer yang berasal dari 22 kandidat. Primer dengan urutan *forward* GCCGGTGAAATTATCGCCAC dan *reverse* CTCGTAATTCGCCGCCATTG memiliki panjang ampikon 1486. Primer ini dapat mendeteksi cemaran *Salmonella* pada karkas ayam pada suhu *annealing* sebesar 58 °C dan konsentrasi primer sebesar 0.8, 1.0 dan 1.2  $\mu$ M, untuk sekuensing konsentrasi 1.2  $\mu$ M memberikan hasil pita yang optimum.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi / Badan Riset dan Inovasi Nasional atas pembiayaan penelitian dalam skema hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) Tahun Anggaran 2021.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arenas, N. E., & L. M. Salazar.** 2019. Steps and Tools for PCR-Based Technique Design. *Biotechnol Bioeng*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.83671.
- CDC.** 2016. National enteric disease surveillance: *Salmonella* annual report. <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>. [21 September 2021].
- CDC.** 2021. *Salmonella* outbreaks linked to backyard poultry. <https://www.cdc.gov/Salmonella/backyardpoultry-05-21/index.html>. [3 Agustus 2021].
- El-Sebay, N. A., H. M. A. Shady, S. A. E. R. El-Zeedy, & A. A. Samy.** 2017. *InvA* gene sequencing of *Salmonella* Typhimurium isolated from Egyptian poultry. *Asian J Sci Res*. 10(3):194-202. doi:10.3923/AJSR.2017.194.202.
- Eng, S. K., P. Pusparajah, N. S. A. Mutalib, H. L. Ser, K. G. Chan, & L. H. Lee.** 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci*. 8(3):284-293. doi:10.1080/21553769.2015.1051243.
- Franco-Duarte R., L. Černáková, S. Kadam, K. S. Kaushik, B. Salehi, A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & et al.** 2019. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. *Microorganisms*. 7(5):130. doi: 10.3390/microorganisms7050130
- Fisher Scientific T.** User Bulletin: Troubleshooting Sanger sequencing data (Pub. no. MAN0014435). [www.thermofisher.com/mvf](http://www.thermofisher.com/mvf). [27 September 2021].
- Innis, M., & D. Gelfand.** 2012. Optimization of PCRs. Di dalam: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, editor. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, United Kingdom. hlm 3-12.
- Issenhuth-Jeanjean, S., P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P. Fields, & F. Weill.** 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*. 165(7):526-530. doi:10.1016/J.RESMIC.2014.07.004.
- Kementan RI.** 2021. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2021. [http://ditjenpkh.pertanian.go.id/userfiles/file/Buku\\_Statistik\\_2021.pdf?time=1633686831406](http://ditjenpkh.pertanian.go.id/userfiles/file/Buku_Statistik_2021.pdf?time=1633686831406). [21 Januari 2022].
- Lilic, M., C. Quezada, & C. Stebbins.** 2010. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of *InvA* to elements of the basal body. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(6):709-713. doi:10.1107/S0907444910010796.
- Promega.** 2021. GoTaq Green Master Mix Usage Information. [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?rev=87143910365a492eb4bd0933f903621a&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?rev=87143910365a492eb4bd0933f903621a&sc_lang=en). [1 Maret 2021].
- Rahn, K., S. De Grandis, R. Clarke, S. McEwen, J. Galán, C. Ginocchio, R. Curtiss, & C. Gyles.** 1992. Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes*. 6(4):271-279. doi:10.1016/0890-8508(92)90002-F.
- Resendiz-Nava, C., Y. Esquivel-Hernandez, A. Alcaraz-Gonzalez, P. Castaneda-Serrano, & G. M. Nava.** 2019. PCR assays based on *invA* gene amplification are not reliable for *Salmonella* detection. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 12(2). doi: 10.5812/JJM.68764.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, & R. Johne.** 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 113(5):1014-1026. doi:10.1111/J.1365-2672.2012.05384.X.
- Wulan, H. A., S. Nurjanah, & W. P. Rahayu.** 2021. Sensitivity of enrichment-PCR method for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis analysis in chicken carcasses. *Food Research*. 5(2):54-61. doi: 10.26656/fr.2017.5(2).429.