

OPTIMASI SUHU ANNEALING PADA METODE UJI PCR UNTUK DETEKSI SALMONELLA ENTERITIDIS DAN SALMONELLA TYPHIMURIUM

Petra Maria Sriulina Siregar (1), Irbatul Habibah (1),

Lynda N. Imanjati (2), Zaki Aminullah (2)

1. Mahasiswa Program Studi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

2. Balai Besar Perakitan dan Modernisasi Veteriner

PENDAHULUAN

Salmonella Enteritidis

Salmonella Enteritidis merupakan bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, fakultatif anaerob, serta memiliki flagela peritrik yang memungkinkan pergerakan aktif. Salmonella Enteritidis sering dikaitkan dengan kontaminasi produk pangan asal unggas, terutama telur dan daging ayam, karena kemampuannya menginfeksi ovarium ayam tanpa menimbulkan gejala klinis yang jelas. Penularan pada manusia umumnya terjadi melalui konsumsi makanan mentah atau kurang matang yang terkontaminasi, dengan gejala klinis berupa diare, demam, mual, muntah, dan nyeri abdomen. Serovar ini memiliki berbagai faktor virulensi, termasuk gen patogenesis pada Salmonella pathogenicity islands (SPI) yang berperan dalam invasi sel epitel usus dan kelangsungan hidup di dalam makrofag.

Salmonella Typhimurium

Salmonella Typhimurium merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang, bersifat motil dengan flagela peritrik, serta mampu bertahan di berbagai lingkungan, terutama pada bahan pangan asal hewan seperti daging, telur, dan susu. Infeksi biasanya terjadi melalui konsumsi makanan atau air yang terkontaminasi dan dapat menimbulkan gejala gastroenteritis seperti diare, demam, dan kram perut. Selain itu, Salmonella Typhimurium dikenal memiliki berbagai faktor virulensi, termasuk kemampuan invasi sel epitel usus dan produksi endotoksin lipopolisakarida yang berkontribusi terhadap respons inflamasi.

Optimasi Suhu Annealing

Optimasi suhu annealing Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan langkah krusial dalam reaksi polymerase chain reaction untuk memastikan penempelan primer pada DNA target berlangsung spesifik dan efisien. Suhu annealing umumnya ditentukan berdasarkan nilai melting temperature (T_m) primer, biasanya sekitar 3–5°C lebih rendah dari T_m terendah pasangan primer agar ikatan hidrogen antara primer dan template stabil namun tetap selektif. Suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan penempelan nonspesifik dan menghasilkan pita amplifikasi tambahan, sedangkan suhu terlalu tinggi dapat menghambat hibridisasi primer sehingga produk PCR menjadi lemah atau tidak terbentuk.

METODE

Persiapan Sampel dan Ekstraksi DNA

Proses isolasi atau yang sering disebut dengan ekstraksi DNA bakteri diawali dengan memindahkan 1 mL sampel kultur broth ke dalam microtube berukuran 1,5 mL, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 g (10.000 RCF) hingga terbentuk endapan. Supernatan dibuang dan endapan yang tersisa ditambahkan 200 μ L nuclease-free water (NFW), selanjutnya dilakukan proses inaktivasi menggunakan waterbath pada suhu 95°C selama 10 menit. Setelah proses inaktivasi, ditambahkan 200 μ L DNAzol ke dalam microtube dan campuran dihomogenkan menggunakan mikropipet, kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 10.000 g. supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam microtube steril berukuran 1,5 mL yang telah diberi kode sampel, lalu ditambahkan 200 μ L etanol absolut dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 10 menit. Sampel selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 5.000 g, kemudian supernatan dibuang dan endapan DNA ditambahkan etanol 70-75%, dihomogenkan secara perlahan, dan disentrifugasi Kembali selama 5 menit pada kecepatan 5.000 g. Supernatan Kembali dibuang dan endapan DNA dikeringkan di dalam biosafety cabinet hingga kering. Endapan DNA yang telah kering kemudian dilarutkan dengan menambahkan 30 μ L NFW ke setiap microtube, kemudian disimpan pada suhu 4°C semalam, dan selanjutnya dipindahkan ke dalam freezer untuk penyimpanan.

Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

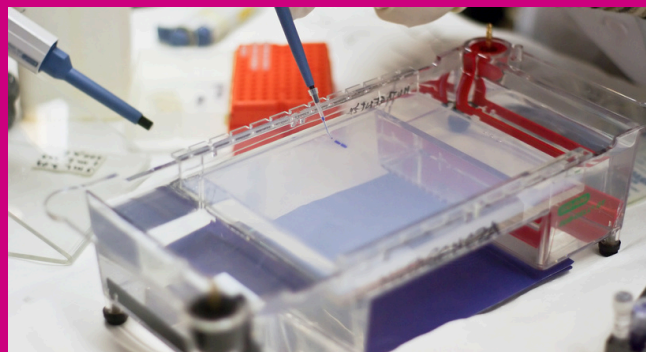
Amplifikasi asam nukleat merupakan proses yang memungkinkan terbentuknya salinan materi genetik salah satunya DNA. Adaptasi amplifikasi asam nukleat saat ini telah berkembang secara in vitro, sehingga saat ini telah menjadi alat yang berguna dalam penelitian, diagnosis klinis, ilmu forensik, pertanian, epidemiologi, dan berbagai bidang lainnya. Adaptasi amplifikasi asam nukleat seperti DNA, secara in vitro di laboratorium dimulai dengan berkembangnya metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Metode PCR bergantung pada proses pemanasan dan pendinginan sampel.

Metode PCR diawali dengan membuat campuran beberapa komponen pada pengujian PCR. Sebelum digunakan dalam proses PCR, primer diencerkan terlebih dahulu menggunakan NFW. Volume yang ditambahkan ke masing-masing tabung utama dihitung dengan berat molekul utama yang tercantum pada setiap tabung. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 μ L untuk setiap microtube berukuran 0,2 mL. Setiap reaksi PCR terdiri dari Taq DNA polymerase dengan volume 12,5 μ L Biorline 2 \times MyTaq HS Red Mix (Meridian Life Science), 9,5 μ L NFW, 1 μ L primer Forward, 1 μ L primer Reverse, dan 1 μ L DNA template.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat thermal cycler peqSTAR (PEQLAB Biotechnology GmbH). Program PCR diawali dengan tahap heated lid pada suhu 110°C. Selanjutnya dilakukan tahap pra-denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit untuk memisahkan DNA untai ganda menjadi dua untai tunggal. Setelah itu dilanjutkan dengan siklus PCR yang terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit. Pada tahap annealing dilakukan menggunakan gradien annealing pada suhu 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, dan 62°C sedangkan primer STM dipilih gradien suhu 53°C, 55°C, 57°C, 59°C, 60°C, dan 62°C yang naik secara bertahap, masing-masing 35 siklus selama 1 menit. Diikuti tahap elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Siklus terakhir diikuti oleh tahap pasca elongasi pada suhu 72°C selama 3 menit. Program diakhiri dengan tahap penyimpanan pada suhu 4°C hingga sampel diambil dari mesin PCR.

Elektroforesis

Proses elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarose 1,5%. Gel agarose 1,5% (b/v) dibuat dengan melarutkan 1,5 g agarose dalam 100 mL TE buffer 1× (AccuGENE™, Lonza) dihomogenkan, kemudian dimasukkan ke dalam microwave sampai larutannya mendidih. Larutan agarose yang sudah dipanaskan diberikan 3 µl pewarna DNA SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) yang diambil menggunakan mikropipet, kemudian dihomogenkan. Setelah pewarna homogen, larutan agarose dituangkan ke dalam cetakan agar elektroforesis yang sudah dipasang sisir untuk membentuk lubang/sumuran pada gel agarose. Gel agarose dalam cetakan dibiarkan hingga mengeras. Setelah mengeras, gel agarose dipasang dalam chamber elektroforesis dan sisir pada gel dilepaskan, larutan TE buffer 1× dituang sampai melebihi permukaan gel. Untuk menentukan ukuran pasangan basa DNA, sumuran pertama diisi dengan marker/ladder 100bp (Clever Scientific Ltd., UK) sebanyak 5 µL. Sumuran berikutnya diisi dengan produk DNA hasil amplifikasi PCR. Sebanyak 8 µL produk PCR dimasukkan ke masing-masing sumuran. Setelah seluruh sampel dimasukkan ke dalam gel agarose, proses elektroforesis dijalankan pada tegangan 100V selama 45 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi pada Clear View UV Transilluminator (Clever Scientific Ltd., UK).



HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil optimasi menunjukkan bahwa hanya pada suhu 52°C pita terbentuk pada primer STM, sedangkan pada primer SEN pita terbentuk pada semua suhu namun pita paling terang berada di suhu 53°C. Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu annealing sangat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA target. Pada suhu annealing yang terlalu rendah, terlihat pita tambahan yang menandakan amplifikasi tidak spesifik. Hal ini terjadi karena primer dapat menempel pada daerah DNA yang tidak sepenuhnya komplementer. Sebaliknya, pada suhu annealing yang terlalu tinggi, pita target tidak muncul karena primer gagal berikatan dengan template DNA. Kondisi ini menyebabkan reaksi PCR tidak berlangsung secara efisien. Kesimpulannya adalah optimasi suhu annealing berperan penting dalam keberhasilan metode PCR untuk deteksi Salmonella Enteritidis dan Salmonella Typhimurium.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggreini, L. D., Dewi, N. M. R. K., Mahardika, I. G. N. K., dan Putra, I. G. N. N. (2024). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing Pada Metode Uji PCR untuk Deteksi Virus African Swine Fever. *Buletin Veteriner Udayana*. 16(1): 218-224.
- Koentjoro, M.P., Dilla, A., Hidayat, M. T., and Prasetyo, E. N. (2023). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* (1255)012066
- Li, J., & Macdonald, J. (2015). Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. In *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 64, pp. 196-211.
- Oludairo, O. O., Kwaga, J. K. P., Kabir, J., Abdu, P. A., Gitanjali, A., et al. (2022). A Review on Salmonella Characteristics, Taxonomy, Nomenclature with Special Reference to Non-Typhoidal and Typhoidal Salmonellosis. *Zagazig Veterinary Journal*. 50(2): p. 161-176.
- Tarabees, R., Elsayed, M. S. A., Shawish, R., Bassiouni, S., and Shehata, A. A. (2017). Isolation and characterization of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium from chicken meat in Egypt. *The Journal Of Infection in Developing Countries*. 11(4):314-319.
- World Organisation for Animal Health (WOAH). (2023). *Salmonellosis*. Paris, France: WOAH.

