

Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. Dengan Metode PCRM

(Rapid Detection of *InvA* Genes in *Salmonella* spp. with The PCR Method)

Soni Muhsinin*, Maria Martina Sulastri, dan Dadih Supriadi

Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

ABSTRACT: *Salmonella* spp. is a major infectious agent in humans through an oral route by contaminating food and drinks. Diseases caused by *Salmonella* spp. called *salmonellosis*. *Salmonella* spp. has an *invA* gene that causes pathogens in humans. *InvA* gene detection can be done by PCR method. The purpose of this study was to develop a rapid detection method for *InvA* gene in *Salmonella* spp. with the PCR method. The steps of the research method were started from *Salmonella* ATCC culture, *Salmonella* ATCC DNA Isolation, Quantitative Analysis of *Salmonella* ATCC DNA, Specific primary design for *InvA* gene detection, Primary Characterization, Optimization of PCR components. Results of isolation of *Salmonella* ATCC DNA were obtained with a DNA concentration of 4.5 ng / ul with DNA purity of 1.66. The PCR primers that have been designed for the *InvA* gene detection consist of one primary pair, namely *InvA*-F: 5' TCGTCATTCCATTACCTACC 3' and *InvA*-R: 5' AAACGTTGAAAACTGAGGA 3' which produced 119 bp of *InvA* gene PCR products. *InvA* gene can be detected quickly using the PCR method that has been optimized by the PCR component.

Keywords: *Salmonella* ATCC; *InvA* gene; DNA Isolation; PCR.

ABSTRAK: *Salmonella* spp. merupakan penyebab infeksi utama pada manusia melalui rute oral dengan cara mengkontaminasi makanan dan minuman. Penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* spp. disebut *salmonellosis*. *Salmonella* spp. memiliki gen *invA* yang menyebabkan patogen pada manusia. Deteksi gen *InvA* dapat dilakukan dengan metode PCR. Tujuan penelitian ini adalah untuk pengembangan metode deteksi cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. dengan metode PCR. Tahapan metode penelitian dimulai dari kultur *Salmonella* ATCC, Isolasi DNA *Salmonella* ATCC, Analisis Kuantitatif DNA *Salmonella* ATCC, Desain primer spesifik untuk deteksi gen *InvA*, Karakterisasi primer, Optimasi komponen PCR. Hasil isolasi DNA *Salmonella* ATCC yang didapat dengan konsentrasi DNA sebesar 4,5 ng/ul dengan kemurnian DNA 1,66. Primer PCR yang telah didesain untuk deteksi gen *InvA* terdiri dari satu pasang primer, yaitu *InvA*-F: 5' TCGTCATTCCATTACCTACC 3' dan *InvA*-R: 5' AAACGTTGAAAACTGAGGA 3' yang menghasilkan produk PCR gen *InvA* sepanjang 119 bp. Gen *InvA* dapat dideteksi dengan cepat menggunakan metode PCR yang telah dioptimasi komponen PCR.

Kata kunci: *Salmonella* ATCC; gen *InvA*; Isolasi DNA; PCR.

Pendahuluan

Salmonella spp. merupakan bakteri berbentuk batang lurus, tidak berspora, bersifat gram negatif, sehingga mempunyai komponen outer layer (lapisan luar) yang tersusun dari LPS (lipopolisakarida) dan dapat berfungsi sebagai endotoksin [1]. *Salmonella* spp. merupakan penyebab utama dari penyakit *salmonellosis* yang disebarkan melalui makanan (*foodborne diseases*) [2]. *Salmonella* spp. yang menginfeksi tubuh melalui makanan akan bertahan hidup kemudian menginvasi mukosa dari usus dan menghasilkan racun. Keracunan oleh *Salmonella* disebabkan karena kontaminasi *Salmonella* dalam jumlah yang signifikan yaitu 10⁷ sel [3].

Salmonella spp. memiliki gen *invA* yang berperan dalam menyebabkan sakit pada manusia. Gen tersebut

terletak di daerah *Salmonella* pathogenicity island (SPI-R) yang mempunyai operon yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan informasi genetik. Gen *invA* pada *Salmonella* spp. terletak di kromosom yang mampu menghasilkan protein yang dapat memberikan sifat invasif untuk menginvasi sel epitel yang terdapat di dalam usus. [2]

Kultur merupakan metode pembiakan bakteri dalam suatu media sebagai *gold standar* untuk deteksi *Salmonella* spp. dengan sensitivitas dan spesifisitas 100%. Akan tetapi metode ini memiliki beberapa kekurangan diantaranya: memerlukan waktu yang lama untuk analisisnya (7-14 hari), bersifat laborious, dan memerlukan lab dengan biosafety level yang tinggi [4]. Selain metode kultur, deteksi *Salmonella* spp. dapat dilakukan dengan uji serologi, uji widal, dan tes tubex. Ketiga metode

Access this article



*Corresponding Author: Soni Muhsinin

Jl. Soekarno-Hatta No.754, Cipadung Kidul, Panyileukan,
Kota Bandung, Jawa Barat 40614 | Email: soni.muhsinin@stfb.ac.id

ini memiliki kekurangan, yaitu nilai sensitivitas sebesar 47-77 % dan nilai spesifisitas sebesar 50-85% [5,6]. Metode molekuler berbasis DNA telah banyak dikembangkan, salah satunya teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR memiliki beberapa keunggulan, diantara: cepat dalam menganalisis hasil (1 hari), memiliki nilai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (>90%) [7-9]. Berdasarkan latar belakang di atas telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk pengembangan metode deteksi cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. dengan metode PCR.

Metode Penelitian

Kultur *Salmonella* ATCC

Kultur *Salmonella* ATCC didapatkan dari Politeknik Kesehatan Bandung. Kultur tersebut kemudian disubkultur pada media agar miring NA (Oxoid) yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi (Pyrex). Hasil koloni subkultur yang tumbuh setelah 1-2 hari diinkubasi pada suhu 37 °C, kemudian digunakan untuk isolasi DNA.

Isolasi DNA *Salmonella* ATCC

Tahapan isolasi DNA sesuai dengan yang tertera pada protokol *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) yaitu masukan 1 ml hasil kultur pada microcentrifuge tube 1,5 ml, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 – 16.000 x selama 2 menit. Hilangkan supernatan, dan *pellet* ditambahkan 600 µl *Nuclei Lysis Solution*, homogenkan dengan menggunakan pipet sampai larutan tersuspensikan. Inkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit untuk melisis sel, tambahkan 3 µl larutan *Rnase* dan kocok tube 2 – 5 kali agar homogen. Inkubasi 15 – 60 menit pada suhu 37 °C, kemudian dinginkan sampel pada suhu kamar. Tambahkan 200 µl *Protein Precipitation Solution* dan vortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik. Inkubasi sampel diatas es selama 5 menit, sentrifugasi pada kecepatan 13.000 – 16.000 x selama 3 menit. Pisahkan supernatan dan tambahkan 600 µl *isopropanol* pada suhu kamar, sentrifugasi pada kecepatan 13.000 – 16.000 x selama 2 menit. Pisahkan supernatant dan tambahkan etanol 70 % dan balik tabung beberapa kali untuk mencuci *pellet*, sentrifugasi pada kecepatan 13.000 – 16.000 x selama 2 menit. Tiriskan tabung pada kertas penyerap bersih dan biarkan *pellet* mengering selama 5 – 10 menit. Tambahkan 100 µl larutan DNA rehidrase dan inkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam atau inkubasi 24 jam pada suhu 4 °C. Simpan DNA pada suhu 2-8 °C [10].

Analisis Kuantitatif DNA *Salmonella* ATCC

Tahap selanjutnya dilakukan perhitungan konsentrasi DNA menggunakan alat Nanodrop (*Thermo Scientific*).

Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut: $\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran}$ [11].

Desain dan Karakterisasi *Primer* Spesifik untuk deteksi gen *InvA*

Desain *primer* dilakukan dengan studi literatur dan *BLASTING Primer* menggunakan software BLAST lewat laman <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. BLAST merupakan salah satu fitur dalam NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) yang berfungsi untuk menganalisis apakah ada kemiripan *primer* yang kita gunakan dengan genom lainnya pada GenBank DNA database. Software BLAST pada NCBI dapat digunakan untuk melakukan perhitungan panjang produk yang dihasilkan berdasarkan posisi *forward primer* dan *reverse primer* pada urutan gen *Salmonella* spp. *Primer* yang sudah dirancang pada tahapan sebelumnya, kemudian akan dilakukan uji *primer* yang meliputi, konten persen GC dari urutan *primer*, kemungkinan *primer* dimer, dan *range temperature melting* (T_m). [12].

Optimasi Komponen PCR

Optimasi komponen PCR yang dilakukan diantaranya: Konsentrasi *Template* DNA (2,5 ul dan 5 ul), *Taq* Polimerase (0-2 U), Konsentrasi $MgCl_2$ (0 – 3 µM), konsentrasi dNTPs (0-250 µM) [13]. Semua komponen PCR ini dilakukan amplifikasi DNA dengan menggunakan alat *Thermocycler* (*Thermo*). Profil PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: suhu denaturasi 95 °C, *annealing* 50 °C dan *extension* 72 °C dengan jumlah siklus 35 siklus. Hasil dari amplifikasi DNA menggunakan PCR ini akan dianalisis produk PCR nya dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarose.

Elektroforesis gel agarose produk PCR

Hasil amplifikasi DNA (*amplicon*) dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi agarosa sebesar 2 % dalam buffer TBE 1 x (*Tris-borate-EDTA*) dan ditambahkan pewarna *Diamond* sebanyak 2 µl. *Amplicon* dimasukan ke dalam sumuran sebanyak 5 µl yang ditambahkan 1 µl *loading dye* (*Promega*). Sebagai penanda (*Marker*) digunakan ladder 100 bp (*Promega*). Elektroforesis dijalankan dengan kondisi tegangan 110 V selama 35 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dibawah sinar *Blue Light* (*Mupid*) kemudian didokumentasikan sebagai hasil analisis

Hasil dan Diskusi

Tahapan isolasi dilakukan untuk mendapatkan DNA murni dari kultur *Salmonella* spp. Isolasi DNA memiliki beberapa tahapan, yaitu: (1) Lisis dinding sel; (2) Purifikasi; dan (3) Presipitasi. Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan protocol KIT Promega [10]. Langkah awal 1 ml kultur di sentrifugasi dengan kecepatan 14.500 rpm. Sentrifugasi bertujuan untuk mengendapkan sel dari komponen lainnya berdasarkan berat jenis molekul. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel dengan penambahan *Nuclei Lysis* [14]. Tahap selanjutnya yaitu penambahan RNase untuk menghilangkan RNA pada larutan DNA. RNase merupakan enzim pendegradasi RNA dan *protein precipitation* digunakan untuk mengendapkan protein [11]. Supernatan yang mengandung DNA dipisahkan dan ditambahkan larutan *isopropanol* sebagai agen presipitasi lanjutan. *Pellet* DNA kemudian dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan pengotor [14]. Supernatan dipisahkan dan *pellet* DNA dikeringkan kemudian ditambahkan DNA rehidrase sebagai pelarut dan mencegah degradasi DNA, selanjutnya dilakukan analisis kuantitas dan kuantitas DNA [10]. Hasil Isolasi DNA dapat dilihat pada gambar 1.

DNA yang telah diisolasi kemudian dihitung kemurnian dan konsentrasinya menggunakan alat Nanodrop (*Thermo Scientific*) yang memiliki prinsip seperti spektrofotometer. Kemurnian DNA dapat dihitung

melalui perbandingan A260 nm dengan A280 nm. Hasil isolasi DNA dikatakan murni apabila rasio perbandingan A260 nm dan A280 nm adalah 1,8- 2,0 [11]. DNA dapat menyerap cahaya ultraviolet karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada λ 260 nm dan kontaminan protein akan menyerap cahaya pada λ 280 [15].

Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh kemurnian DNA 1,66 yang menunjukkan adanya sedikit kandungan protein, sehingga masih dapat digunakan untuk proses amplifikasi [11]. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi DNA yang didapat yaitu 4,5 ng/ μ l.

Primer yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan literatur jurnal dengan gen target *InvA* yaitu *InvA-F*: 5' TCGTCATTCCATTACCTACC 3' dan *InvA-R*: 5' AAACGTTGAAAACTGAGGA 3' yang menghasilkan panjang produk 119 bp [16]. Tahap selanjutnya dilakukan karakterisasi *primer* untuk melihat kualitas *primer* dengan pengujian bioinformatika menggunakan software BLAST [12]. Hasil analisis BLAST (*Gambar 2*) menunjukkan bahwa urutan *primer* yang digunakan spesifik hanya terdapat pada *Salmonella*. Tahap selanjutnya dilakukan uji *primer* untuk melihat kualitas *primer* dan panjang produk PCR yang dihasilkan. Berdasarkan hasil dari BLAST *Primer* NCBI (*Gambar 3*) panjang produk yang dihasilkan dari amplifikasi PCR yaitu 119 bp dengan GC % dari *primer forward* 45% dan reverse 35 %.



Gambar 1. Hasil isolasi DNA salmonella ATCC

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain SL1344RX genome	40.1	341	100%	0.007	100%	CP011233.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110222 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007323.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120685 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007339.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120213 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007344.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120968 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007378.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20122022 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007412.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20082034_complete genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007425.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111515 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007325.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111510 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007498.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20094301 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007469.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20084824 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007467.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20084644 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007466.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121747 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007464.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120929 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007463.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120009 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007438.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120051 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007433.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121765 genome	40.1	262	100%	0.007	100%	CP007429.2

Gambar 2. Primer BLAST

Hasil pengujian pada NCBI, primer dari literatur dapat menempel pada gen *InvA*, untuk primer forward pada panjang 167 bp dan primer reverse 285 bp dengan menghasilkan produk 119 bp yang ditunjukkan pada Gambar 3. Urutan nukleotida primer forward dan reverse terdapat pada gen *InvA* sehingga dapat menempel pada gen tersebut (Gambar 4).

Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu DNA template, primer, MgCl₂, enzim polimerase, suhu, waktu dan jumlah siklus. Optimasi PCR perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mendapatkan kondisi PCR yang tepat sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik [17]. Konsentrasi template DNA yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang tipis dan tidak jelas. Sejalan dengan hal tersebut volume template DNA sangat berkaitan dengan konsentrasi primer dan volume total reaksi sehingga perlu dicari optimalisasi rasio antara volume template DNA dengan primer [17]. Berdasarkan hasil elektroforegram (Gambar 5), terlihat jelas perbedaan ketebalan pita DNA yang dihasilkan dari volume template DNA 0,5 µL dan 1 µL. Pita DNA pada volume 0,5 µL lebih tipis dibandingkan dengan pita pada volume 1 µL menunjukkan konsentrasi template pada volume 0,5 µL terlalu kecil sehingga menghasilkan pita yang tidak jelas.

Enzim polimerase berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA pada proses PCR enzim ini

diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Kemampuan mengkatalisis reaksi polimerasi DNA pada proses PCR yang terjadi pada tahap ekstensi. Konsentrasi enzim polimerase yang tidak tepat dapat menyebabkan hasil pita DNA yang smear, maka dari itu optimasi konsentrasi enzim polimerase diperlukan agar proses amplifikasi berjalan dengan baik [18]. Hasil elektroforegram (Gambar 6) dari optimasi konsentrasi Taq Polimerase pada konsentrasi 2 U dan 1,5 U terjadi smear pada pita DNA yang menunjukkan terjadinya kelebihan konsentrasi enzim polimerase. Konsentrasi Taq polimerase yang berlebihan dapat mengakibatkan amplifikasi DNA non target yang menghasilkan produk yang tidak spesifik dan jika konsentrasi Taq polimerase rendah menyebabkan proses amplifikasi berjalan tidak baik atau tidak terjadi amplifikasi DNA [20]. Berdasarkan hasil elektroforegram (Gambar 6) konsentrasi optimal untuk Taq polimerase yaitu 1 U yang menunjukkan hasil pita yang tebal dan terlihat jelas, sedangkan untuk konsentrasi 0,5 U pita yang dihasilkan kurang jelas dan tipis karena konsentrasi Taq polimerase yang rendah. Hasil pada konsentrasi 0 U tidak ada pita yang muncul menunjukkan proses optimasi konsentrasi Taq polimerase tidak terjadi kontaminasi.

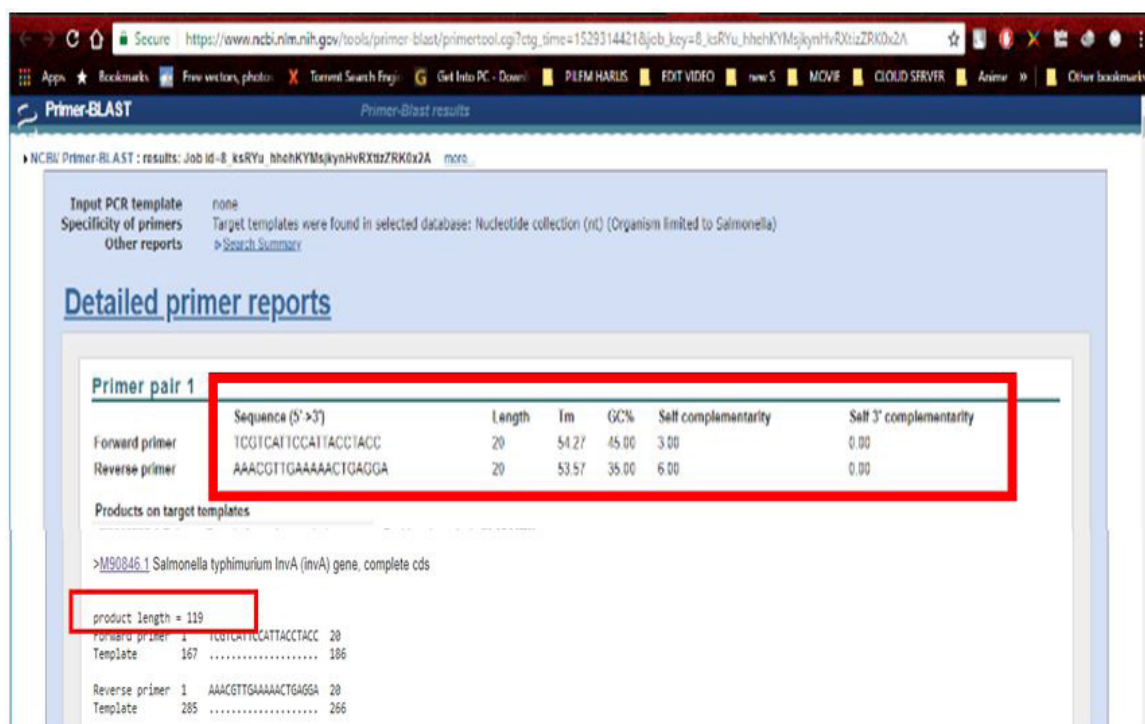
Konsentrasi ion Mg²⁺ berpengaruh besar terhadap spesifisitas dan jumlah produk (yield) PCR. Umumnya jika ion Mg²⁺ kurang akan menurunkan yield, sedangkan jika ion Mg²⁺ berlebih akan menghasilkan produk non

spesifik. Magnesium mempengaruhi penempelan *primer* serta aktifitas enzim [21]. Kondisi optimal PCR untuk fragmen DNA yaitu pada konsentrasi ion $MgCl_2$ 1,5 μM . Hasil *elektroforegram* pada konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 μM menunjukkan pita cukup tebal dan jelas dari pada konsentrasi 0,5 μM dan 1 μM (Gambar 7). Konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 μM sudah menunjukkan pita yang cukup tebal sehingga diambil konsentrasi terendah yang menghasilkan hasil pita yang jelas, sedangkan pada konsentrasi 3 μM amplifikasi menunjukkan hasil yang negatif. Konsentrasi ion Mg^{2+} yang terlalu besar menyebabkan magnesium bebas berlebih mengurangi aktivitas enzim dan banyaknya dNTPs disekitar Taq polimerase menyebabkan terjadi kesalahan dalam sintesis DNA baru dan proses amplifikasi tidak terjadi. Pada penelitian ini konsentrasi $MgCl_2$ yang rendah menyebabkan intensitas pita yang rendah pada produk PCR. Hal ini disebabkan rendahnya aktifitas Taq polimerase. Konsentrasi $MgCl_2$ yang tinggi juga mempengaruhi jumlah pita yang dihasilkan dan mengakibatkan penurunan intensitas [22].

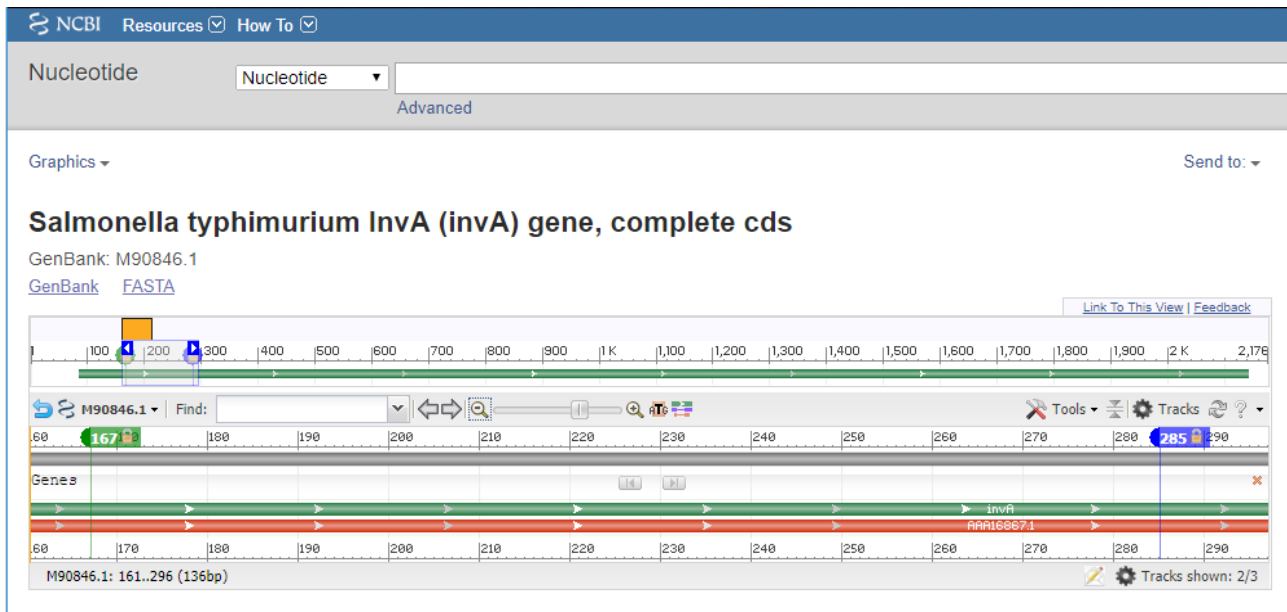
dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan [18]. dNTPs merupakan

komponen yang sangat berhubungan dengan ion Mg^{2+} . Hasil elektroforesis menunjukkan amplifikasi negatif pada konsentrasi 250 μM dan 300 μM (Gambar 8). Konsentrasi dNTPs yang besar menyebabkan magnesium yang tersedia terikat dengan dNTPs sehingga tidak adanya magnesium bebas menyebabkan enzim polimerase tidak aktif dan tidak terjadinya amplifikasi DNA. Ada interaksi antara Mg^{2+} dan dNTPs menyebabkan perubahan konsentrasi dNTPs dan mempengaruhi konsentrasi Mg^{2+} dalam reaksi. Bila digunakan konsentrasi dNTPs yang tinggi, konsentrasi Mg^{2+} sebaiknya juga dinaikkan. Bila konsentrasi dNTPs berlebih, dNTPs akan berikatan Mg^{2+} sehingga mengurangi konsentrasi Mg^{2+} . Ion Mg^{2+} berperan dalam membentuk kompleks dengan dNTPs sehingga dNTPs menjadi semakin larut, meningkatkan aktivitas enzim polimerase. Berdasarkan hasil *elektroforegram* (Gambar 8) menunjukkan konsentrasi dNTPs yang optimal pada konsentrasi 150 μM .

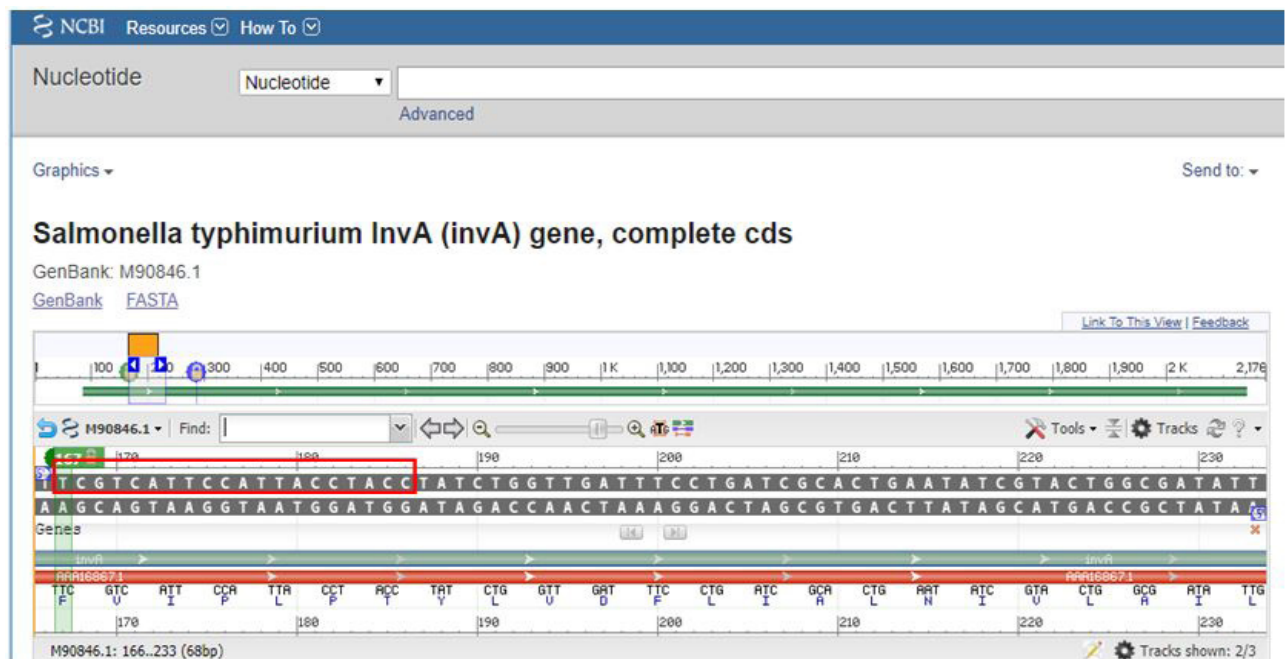
Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi komponen PCR yang optimal ditunjukkan pada Tabel 1 dengan kondisi amplifikasi berdasarkan literatur jurnal penelitian yaitu suhu denaturasi 95 oC, *annealing* 50 oC dan *extension* 72 oC dengan jumlah siklus 35 siklus [16].



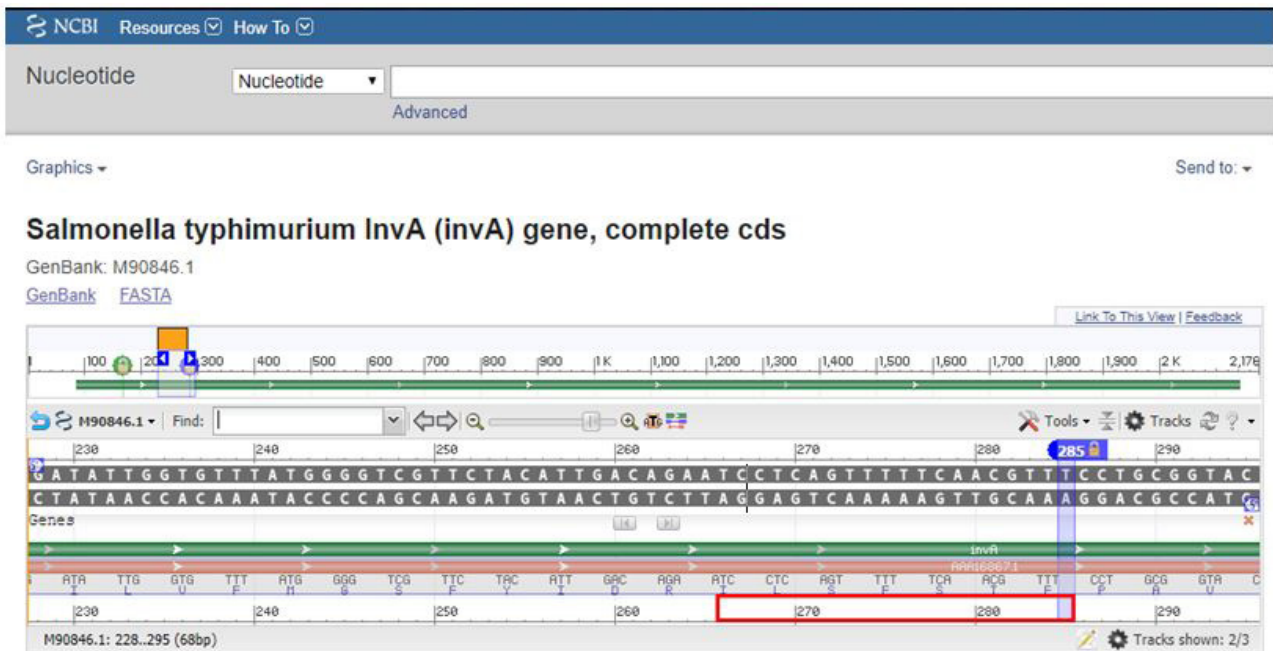
Gambar 3. Hasil primer BLAST



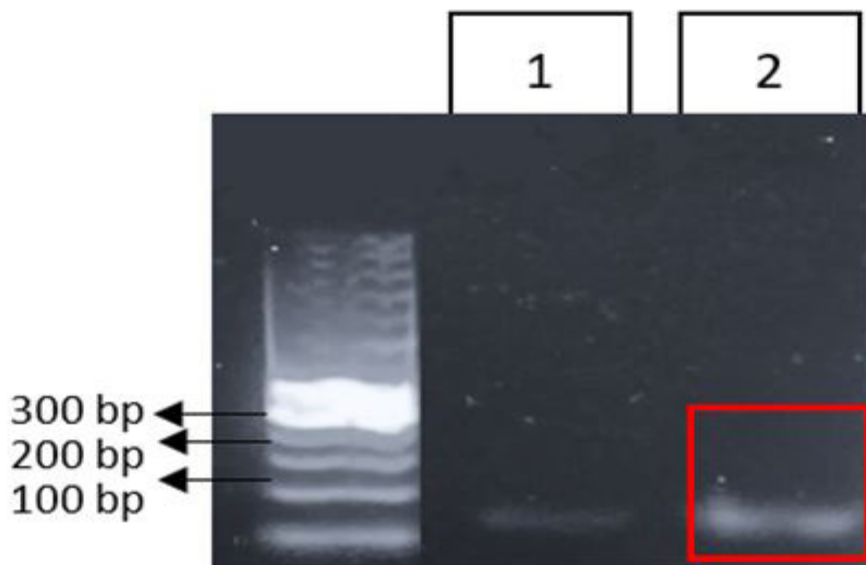
Gambar 4a. Hasil penempelan primer inva gene Urutan gen InvA



Gambar 4b. Hasil penempelan primer inva gene Penempelan primer forward pada Panjang 167 bp



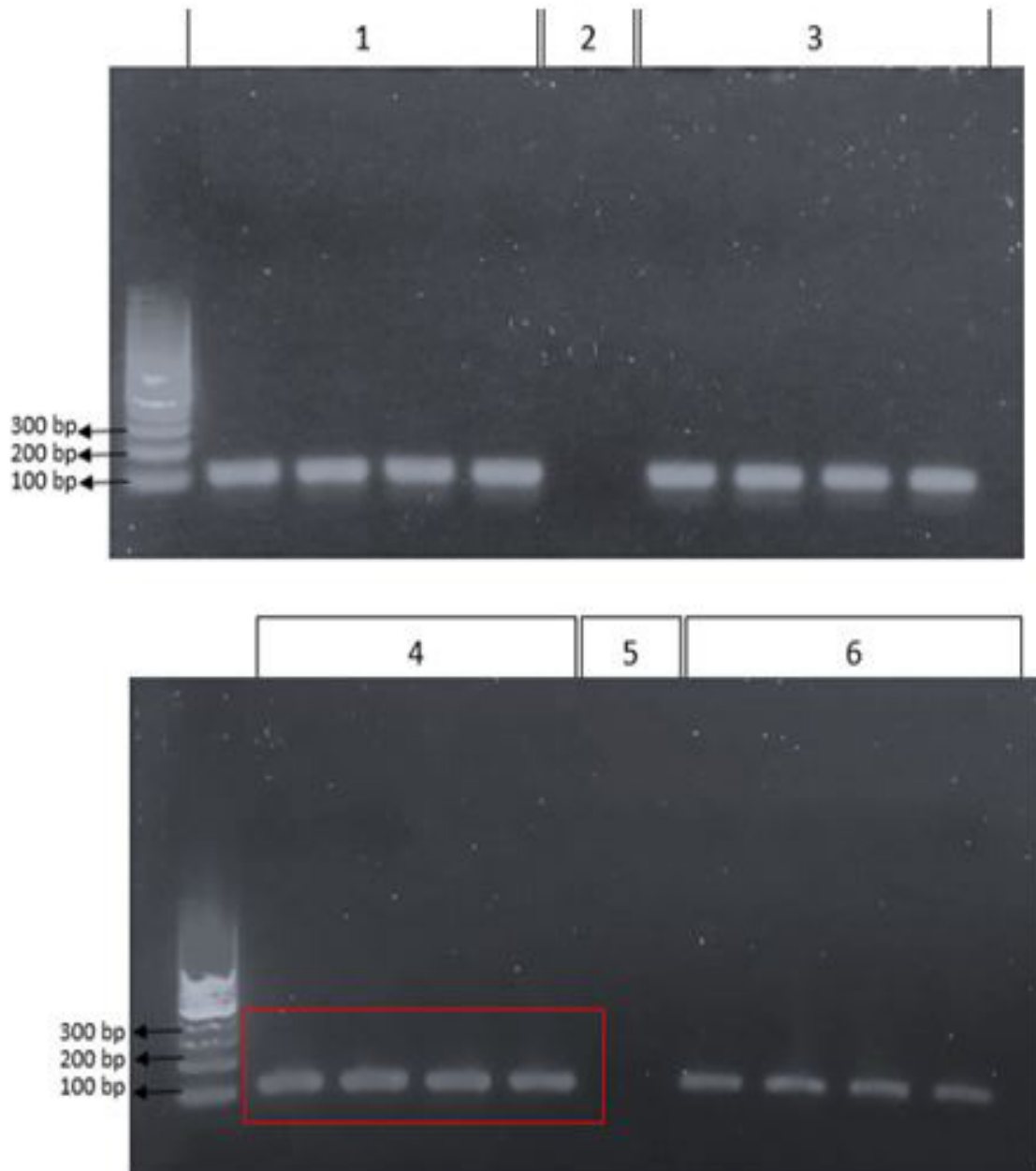
Gambar 4c. Hasil penempelan primer *invA* gene Penempelan primer reverse pada Panjang 285 bp



Gambar 5. Hasil Optimasi Konsentrasi Template DNA

Keterangan :

- (1) Pita hasil elektrofogram pada volume DNA 0,5 µl.
- (2) Pita hasil elektrofogram pada volume DNA 1 µl



Gambar 6. Hasil optimasi konsentrasi taq polimerase

Keterangan :

- (1) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 2 U
- (2) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0 U
- (3) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 1,5 U
- (4) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 1 U
- (5) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0 U
- (6) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0,5 U



Gambar 7. Hasil optimasi konsentrasi MgCl₂

Keterangan :

- (1) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0 μM
- (2) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0,5 μM
- (3) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 1 μM
- (4) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 1,5 μM
- (5) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 2 μM
- (6) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 2,5 μM
- (7) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 3 μM



Gambar 8. Hasil optimasi DNTPs

Keterangan :

- (1) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 50 μM
- (2) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 100 μM
- (3) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 150 μM
- (4) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 200 μM
- (5) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 250 μM
- (6) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 300 μM
- (7) Pita hasil elektroforegram pada konsentrasi 0 μM

Tabel 1. Tabel Konsentrasi Optimal Komponen PCR

No	Komponen	Konsentrasi Awal	Konsentrasi PCR	Volume
1	Taq Polimerase	5 U	1 U	0,2 µl
2	Buffer	5 X	1 X	10 µl
3	MgCl ₂	25 µM	1,5 µM	3 µl
4	dNTPs	10 mM	150 µM	0,75 µl
5	Primer Forward	100 µM	100 nM	5 µl
6	Primer Reverse	100 µM	100 nM	5 µl
7	DNA Template	4,5 ng/µl	4,5 ng/µl	1 µl
8	NFW			ad 50 µl

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini, Metode PCR gel base dapat mendeteksi gen *InvA* dengan *primer* yang spesifik dan komponen PCR yang telah dioptimasi dengan waktu analisis yang cepat.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada P3M Sekolah Tinggi Farmasi Bandung telah mendanai penelitian ini melalui hibah Riset Internal STFB tahun 2018.

Referensi

[1] Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. Mikrobiologi Kedokteran, Jakarta: EGC; 2005.

[2] Pham, O. H., & McSorley, S. J. Protective host immune responses to Salmonella infection. *Future microbiology*. 2015;10(1),101-110.

[3] Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. Modern food microbiology. Food Science Text Series. New York: Springer; 2005.

[4] Dzen, S. M., Roekistiningsih, S. S., Winarsih, S., Sumarno, I. S., Noorhamdani, A. S. Bakteriologi Medik. Malang: Bayumedia; 2003.

[5] Prasetyo, R. V., Ismoedijanto, V. Metode Diagnostik Demam Tifoid pada Anak. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unair; 2009.

[6] Olsen, S. J., Pruckler, J., Bibb, W., Thanh, N. T. M., Trinh, T. M., Minh, N. T., Chau, N. V. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(5):1885-1889.

[7] Zeitoun, H., Kassem, M., Raafat, D., AbouShlieb, H., Fanaki, N. Microbiological testing of pharmaceuticals and cosmetics in Egypt. *BMC microbiology*. 2015;15(1):275.

[8] He, X., Xu, X., Li, K., Liu, B., Yue, T. Identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and variants using a novel multiplex PCR assay. *Food control*. 2016;65:152-159.

[9] Horton, R. A., Card, R., Randall, L. P., & Teale, C. J. Differentiation of UK endemic strains of *Salmonella enterica* serovar Newport from epidemic North American strains by PCR detection of a truncated *bapA* chromosomal gene. *Research in veterinary science*. 2016;104:113-116.

[10] Corporation, P. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA. Solutions. 2009; 1123–1126.

[11] Sambrook, J., David W. Russell. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press Book 1&2; 2001.

[12] Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012;13(1): 134.

[13] Yuwono. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction, Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini, Yogyakarta: Andi; 2006.

[14] Hoarau G, Coyer JA, Stam WT, Olsen JL. A fast and inexpensive DNA extraction/purification protocol for brown macroalgae. *Molecular Ecology Notes*. 2007;7:191–193.

[15] Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM., Deng X. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2003;21:177a-177g.

[16] Alves, J., Hirooka, E.Y., Oliveira, T.C.R.M. de. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. *LWT Food Sci. Technol*. 2016;72: 175 –181.

[17] Grunewald, H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Dalam Bartlett dan Stirling (Eds). *Method in Molecular Biology: PCR Protocols Second Edition*. Humana Press; 2007.

[18] Jalali, M., Zaborowska, J., Jalali, M. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2016:1-18.

[20] Haley, S. D., Miklas, P. N., Afanador, L., Kelly, J. D. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker Variability Between and Within Gene Pools of Common Bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 2004;199 (1):122-125.

[21] Padmalatha, K., M.N.V. Prasad. Optimization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of Selected Medicinal and Aromatic



Copyright © 2018 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)