

**SELEKSI FRAGMENT DNA SPESIFIK SEBAGAI PELACAK
UNTUK DETEKSI *SALMONELLA***Ambar Pertiwiningrum¹, Ag. Yuswanto², dan Widya Asmara³**INTISARI**

Salmonella sp. merupakan organisme patogen pada bahan pangan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan fragmen DNA spesifik dari *Salmonella typhimurium* yang dapat digunakan sebagai pelacak dalam pengujian terhadap *Salmonella* sp. Salah satunya adalah teknologi hibridisasi dengan menggunakan pelacak berlabel non radioaktif yang mempunyai keuntungan yang lebih dibandingkan dengan pelacak berlabel radioaktif yang berbahaya. Dalam penelitian ini digunakan pelacak berlabel non radioaktif untuk deteksi terhadap *Salmonella* sp. Pelacak dibuat dari fragmen DNA spesifik dengan berdasarkan pada konstruksi pustaka genom *Salmonella typhimurium*, melalui strategi kloning dengan *E. coli* DH5- α sebagai inang dan pUC19 sebagai vektor. Hasil klon yang positif diseleksi untuk dibuat pelacak. Seleksi terhadap fragmen DNA yang akan dibuat pelacak dengan cara melabel fragmen-fragmen DNA dan dihibridisasikan dengan beberapa isolat *Salmonella* sp. dan beberapa isolat patogen yang lain. Pelacak yang terpilih adalah pelacak yang melakukan hibridisasi terhadap *Salmonella* sp. saja dan tidak terhadap bakteri patogen yang lain. Metode hibridisasi yang digunakan adalah hibridisasi koloni. Hasil penelitian ini menunjukkan fragmen DNA yang melakukan hibridisasi dengan *Salmonella* sp. saja dan tidak dengan yang lainnya adalah fragmen dengan ukuran 580 bp. Fragmen DNA yang melakukan hibridisasi dengan *Salmonella* sp. dan *E. coli* yaitu fragmen DNA dengan ukuran 310 bp, 700 bp, 3020 bp dan 3250 bp.

(Kata Kunci: *Salmonella*, Pelacak, Fragmen DNA Spesifik).

Buletin Peternakan 23 (3): 140 - 148, 1999

¹ Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

³ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

SELECTION OF SPECIFIC DNA FRAGMENT AS A PROBE FOR *SALMONELLA* DETECTION

ABSTRACT

Salmonella sp. are organisms among the most actively investigated of the food borne pathogens. A continuing research for the detection procedures of this organism has always been made in this field. Technology of hybridization using non radioactive labelled probe has now becoming more popular compared to the radioactive one, due to its lack of hazardous effects. In this study a method using non radioactive labelled DNA probe for the detection of *Salmonella* sp. was used. Probe was made from specific DNA fragments constructed from the genomic library of *Salmonella typhimurium*, cloning strategy using *E.coli* DH5- α as a host organism and pUC19 as a vector. The positive clone obtained was selected for the appropriate probe for hybridization method. Selecting of DNA fragments were done with labelling to DNA fragments, then hybridized for *Salmonellas* and the other pathogen microorganisms. The selected probe was hybridized with *Salmonella* sp. and not other pathogen microorganism. The method for hybridization was Colony hybridization. The results indicated that the specific DNA fragment DNA hybridized with *Salmonella* sp. only, had the length of 580 basepairs. Other fragments were hybridized with *Salmonella* sp. and *E.coli* had lengths 310 bp, 700 bp, 3250 bp and 3020 bp.

(Key Words : *Salmonella*, Probe, Specific DNA Fragment).

Pengantar

Salmonella sp. merupakan bakteri patogen yang selama ini masih menjadi permasalahan yang serius terhadap kesehatan manusia yang dapat menyebabkan salmonellosis. *Salmonella* sp. dapat mencemari produk pangan yang berasal dari ternak, ikan maupun lingkungan sekitar. *Salmonella* sp. merupakan salah satu penentu kualitas pangan yang akan dikonsumsi oleh manusia, sehingga dengan tidak adanya kontaminasi oleh *Salmonella* sp. atau bebas dari *Salmonella* sp. merupakan salah satu syarat dari produk pangan yang akan dikonsumsi oleh manusia.

Pengujian terhadap *Salmonella* sp. selama ini yang telah banyak dilakukan adalah metode konvensional dengan cara pengujian pada media selektif yang dilanjutkan dengan pengujian biokimiawi dan konfirmasi serologis yang membutuhkan waktu yang lama (FDA, 1995).

Untuk mengatasi pengujian terhadap *Salmonella* sp. yang relatif lama tersebut telah banyak dikembangkan beberapa metode untuk pengujian terhadap *Salmonella* sp. yang lebih

cepat. Metode-metode tersebut antara lain uji *enzyme immunoassays* (Mattingly dan Gehle, 1984; Swaminathan, *et. al.*, 1985), penggunaan antibodi monoklonal (Mattingly, *et. al.*, 1985), uji hibridisasi DNA (Fitt, 1985; Flowers, *et. al.*, 1987; Tsen, *et. al.*, 1989).

Pengujian dengan menggunakan metode hibridisasi DNA lebih cepat, sensitif dan spesifik terhadap *Salmonella* sp. dibandingkan dengan metode konvensional (Flowers, *et. al.*, 1987). *False positive* yang dihasilkan lebih sedikit (3,7%) dan tidak ada *false negative* (Rose, *et. al.*, 1987). Metode hibridisasi DNA telah dikomersialkan dengan metode dari *Gene Trek* yang menggunakan pelacak berlabel radioaktif. Metode ini untuk skala laboratorium yang relatif kecil sangat mahal dan memerlukan penanganan yang serius dengan adanya kandungan bahan radioaktif.

Pengembangan metode hibridisasi DNA berdasarkan atas homologi dari DNA dari bakteri yang mempunyai kekerabatan yang dekat. Dengan dasar tersebut dapat diestimasikan dengan hibridisasi DNA-DNA. Dengan berkembangnya rekayasa genetika telah diperoleh kemungkinan untuk memilih

dan memproduksi suatu sekuen spesifik DNA dari mikroorganisme tertentu. Sekuen tersebut dikembangkan untuk uji yang spesifik terhadap organisme tertentu melalui teknik hibridisasi (Flowers, 1985).

Metode dengan hibridisasi DNA dapat dilakukan dengan penggunaan pelacak yang berasal dari fragmen DNA *Salmonella* sp. yang akan dilabel dengan label non radioaktif, sehingga relatif aman dan lebih mudah aplikasinya.

Pelabelan pelacak dengan non radioaktif mempunyai keuntungan lebih aman, murah, stabil dalam penyimpanan. Pelabelan non radioaktif dapat dilakukan dengan cara langsung dan tidak langsung. Pada cara langsung suatu label dapat diikat oleh asam nukleat melalui ikatan kovalen dan non kovalen. Pelabelan tidak langsung dengan cara menggunakan *dig dUTP* (*digoxigenin*), *dUTP* berikatan pada hapten steroid *digoxigenin* dan deteksinya menggunakan antibodi anti *digoxigenin alkaline phosphatase* (Old dan Primrose, 1989).

Pengembangan pelacak yang diperoleh dari fragmen DNA yang spesifik hasil kloning dilakukan oleh Fitts (1985) dengan menggunakan enzim restriksi *Bam*HI sehingga didapat fragmen dengan ukuran 4,1 kb. Fragmen tersebut dibuat pelacak dengan label radioaktif dan dihibridisasikan dengan *Salmonella* sp. dan bakteri yang lain dengan hasil diperoleh reaksi positif dengan *Salmonella* sp. dan masih ditemukan pada *E. coli*. Penelitian terhadap hibridisasi DNA dengan menggunakan fragmen DNA spesifik juga dilakukan oleh Tsen *et. al.* (1989), yang diperoleh dengan pemotongan enzim restriksi *Hind*III dengan ukuran 1,8 kb yang diberi label non radioaktif. Hasil positif hanya terhadap *Salmonella* sp. saja dan tidak dengan yang lain. Pembuatan pelacak dari kedua peneliti tersebut dengan fragmen DNA yang spesifik terhadap *Salmonella* sp. dan tidak dengan yang lain, dikarenakan dalam *Salmonella* sp. belum diketahui gen pengkode faktor virulensi dan toksin (Fitts, 1985). Pelacak dengan ukuran fragmen yang kecil akan lebih mudah dan

cepat melakukan hibridisasi karena fragmen dengan ukuran kecil akan lebih mudah dan cepat berdifusi daripada fragmen yang panjang (Lamb dan Birni, 1995; Old dan Primrose, 1989; Kirby, 1990).

Pada penelitian ini digunakan pelacak yang berlabel *digoxigenin-dUTP* untuk hibridisasi DNA pada deteksi terhadap cemaran *Salmonella* sp. Untuk mendapatkan pelacak tersebut diawali dengan pembuatan pustaka DNA. Fragmen DNA yang spesifik untuk *Salmonella* sp. dipilih untuk pelacak.

Penelitian ini bertujuan untuk memilih fragmen DNA *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) yang spesifik untuk digunakan sebagai pelacak dalam pengujian terhadap *Salmonella*.

Bahan dan Metode Penelitian

A. Bahan penelitian

S. typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* sp. FNCC 134, *Salmonella* sp. FNCC 97, *Salmonella* sp. FNCC 139, *Salmonella typhi*, *Yersenia enterocolitica* JCM 7577, *E. coli* JCM 1649, *E. coli* FNCC 91, *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli* DH5 α , plasmid pUC19,

B. Metode penelitian

B.1. Isolasi DNA total *S. typhimurium* ATCC 14028

Satu koloni bakteri *S. typhimurium* ATCC (American Type Culture Collection) 14028 diinokulasikan pada 5 ml media Luria Bertani, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur tersebut dipindahkan pada 100 ml media LB dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 4 jam, kemudian setiap 20 ml kultur bakteri diinokulasikan pada media LB agar yang dibuat miring dalam botol dan diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37°C. 100 ml kultur bakteri yang telah ditumbuhkan semalam untuk kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 g selama 10 menit. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 50 mM EDTA dan disentrifugasi dengan kecepatan 7000 g selama 5 menit. Pelet diresuspensi dengan 2 ml larutan yang mengandung 25 % sukrosa dan

0,5 EDTA, pH 8,0 (9:1). Campuran ini ditambah lisosim 100 μ l (10 mg/ml) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan 1200 μ l NaCl 5 M, 200 μ l 0,5 M, 1500 μ l SDS 20 %. Proteinase K ditambahkan sebanyak 100 μ l (10 mg/ml), kemudian diinkubasikan pada suhu 50°C selama 1 jam. Campuran tersebut diekstraksi kloroform (1:1), dan diendapkan dengan etanol absolut dingin 2 x volume. Pada tahap ini akan terbentuk benang DNA yang mengumpul yang kemudian diambil dengan pipet pasteur yang ujungnya dibengkokkan. DNA dipindahkan ke dalam tabung ependorf yang telah diberi TE pH 8,0.

B.2. Isolasi DNA plasmid

Teknik isolasi DNA plasmid dengan metoda lisis alkali (Sambrook *et al.*, 1989), sedangkan pemurnian plasmid menggunakan metode ekstrak fenol. Teknik ini juga digunakan untuk isolasi plasmid rekombinan.

B.3. Metode kloning fragmen DNA *S. typhimurium* ke pUC19

DNA genom *S. typhimurium* ATCC 14028 dan pUC19 dipotong dengan enzim *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* untuk masing-masing baik dilakukan digesti tunggal maupun digesti ganda untuk ketiga enzim tersebut. Hasil pemotongan DNA genom diligasasi dengan enzim T4 DNA ligase dengan hasil pemotongan pUC19 yang telah dilakukan defosforilasi dengan enzim *calf intestinal phosphatase* (CIP). Campuran ligasi dengan perbandingan 2 : 1 tersebut kemudian ditransformasikan ke *E. coli* DH5- α menurut metode Sambrook, *et al.* (1989) dengan menggunakan campuran MOPS, rubidium klorida dan kalsium klorida. Transformasi diseleksi pada medium LB yang mengandung ampisilin (100 μ g/ml), IPTG dan X-gal (Sambrook, *et al.*, 1989)

B.4. Analisis restriksi dan pengambilan sisipan dengan metode elektroelusi

Untuk mengetahui ukuran fragmen DNA yang tersisip pada pUC19 dilakukan

pemotongan dengan enzim restriksi (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*). Plasmid rekombinan yang telah dipotong dengan enzim *BamHI-HindIII*, dielektroforesis pada gel agarose 1,5 % yang mengandung 0,5 μ g/ml etidium bromid, dengan tegangan 100 volt. Gel dipotong dan dimurnikan pada bagian fragmen sisipan dengan metode elektroelusi (Sambrook, *et al.* 1989).

B.5. Sintesis DNA pelacak dan hibridisasi koloni

Fragmen DNA sisipan dari *S. typhimurium* hasil elusi (pemotongan dengan *BamHI* dan *HindIII*) dilabel dengan *Non-radioactive DNA Labelling and Detection Kit* (Boehringer-Mannheim, Jerman) yaitu menggunakan Dig-DUTP dengan metode *random priming*. Fragmen DNA tersebut yang akan diseleksi sebagai pelacak untuk deteksi *Salmonella* sp. dengan dihibridisasikan terhadap beberapa isolat *Salmonella* dan beberapa bakteri patogen yang lain.

Hibridisasi dilakukan dengan metode dari Boehringer Mannheim (1995), sebelum dilakukan hibridisasi terlebih dahulu menumbuhkan isolat bakteri *Salmonella* sp. dan beberapa isolat bakteri patogen yang lain. Inokulasi dilakukan pada membran nilon yang diletakkan di atas media agar LB, selanjutnya diinkubasikan selama semalam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh pada membran di lisis dengan larutan 10% SDS selama 5 menit, didenaturasi dengan larutan denaturasi selama 5 menit, dan dinetralisasi dengan larutan penetral selama 5 menit untuk selanjutnya dipindah pada larutan 2X SSC selama 5 menit. Membran difiksasi dengan *UV-crosslink* selama 5 menit. Pelacak yang akan dipakai didenaturasi dahulu pada suhu 95°C selama 10 menit kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Hibridisasi dilakukan pada suhu 65°C selama semalam dengan pelacak berlabel non radioaktif.

Hasil dan Pembahasan

A. Kloning Fragmen DNA *S. typhimurium* ATCC 14028

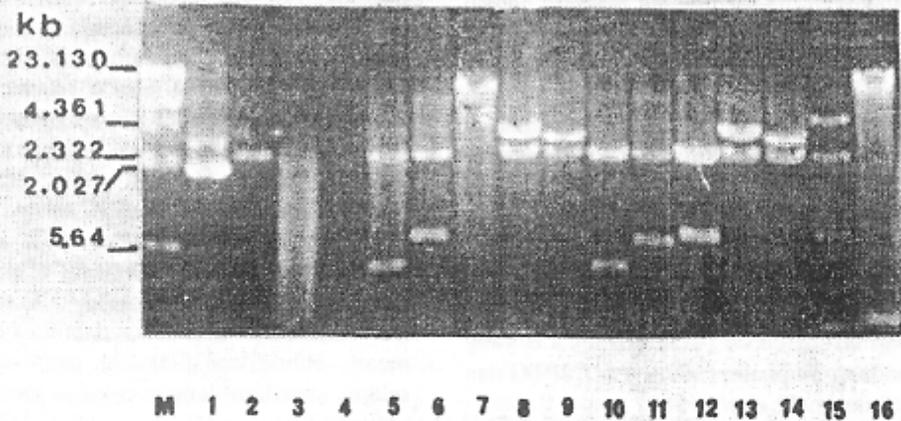
Kloning DNA yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi penyiapan sumber DNA total dari *S. typhimurium* dan penyiapan pUC19, penyambungan DNA sisipan dengan vektor dan transformasi hasil ligasi ke sel inang *E. coli* DH5 α .

Pada awal penelitian pemotongan DNA *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 menggunakan enzim *Eco*R1, *Bam*HI dan *Hind*III baik secara tunggal maupun ganda, demikian juga untuk pUC19. Hasil yang diperoleh hanya yang dipotong dengan digesti ganda *Bam*HI dan *Hind*III yang berhasil baik (Gambar 1) Hal ini disebabkan pemotongan ganda terhadap plasmid akan didapatkan ujung runcing dan tidak akan melakukan sirkuler kembali.

Hasil pemotongan DNA *S. Typhimurium* dan pUC19 untuk selanjutnya diligasikan dengan bantuan enzim ligase. Enzim DNA ligase berfungsi untuk mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus 3' OH pada ujung rantai DNA. Dalam hal ini pUC19

dan gugus 5'-P pada ujung rantai DNA *S. typhimurium* (Brown, 1986; Adams *et. al.* 1986). Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke *E. coli* DH5 α . Hasil transformasi plasmid rekombinan tersebut kemudian diseleksi dengan media LB padat yang mengandung ampisilin dan diberi IPTG dan X-Gal, sehingga diperoleh koloni biru dan putih (Gambar 2). Koloni biru dan putih pada media tersebut, koloni dengan warna biru menandakan bahwa plasmid tidak mengandung sisipan DNA dan koloni yang putih menandakan adanya plasmid yang membawa sisipan DNA. Pembentukan koloni biru dan putih menunjukkan bahwa adanya kemampuan sel untuk melakukan komplementasi alfa.

Kurang lebih 50 koloni putih yang diperoleh, diambil sampel sebanyak 17 koloni untuk selanjutnya diisolasi dan kemudian DNA plasmid rekombinan yang terlihat di elektroforesis sebanyak 6 plasmid. Keenam plasmid tersebut kemudian dianalisis direstriksi dengan enzim yang sama dengan saat pemotongan DNA yaitu *Bam*HI dan *Hind*III untuk melepaskan fragmen sisipan dari vektornya dan untuk mengetahui ukuran dari fragmen tersebut.



Gambar 1 Elektroforesis DNA *S. typhimurium*, pUC19 dan plasmid rekombinan (M=Marker λ *Hind*III, 1=pUC19 utuh, 2=pUC dipotong *Bam*HI dan *Hind*III, 3&7=Genom *S. typhimurium* dipotong *Bam*HI dan *Hind*III, 5&10=R13, 6&11=R15, 8&13= R25, 9&14=R26, 12=R24, 15=R27, 16= Genom total *S. typhimurium*)

B. Analisis Restriksi Hasil Kloning Fragmen DNA *S. typhimurium* dan Pelabelan dengan Non Radioaktif

Hasil penelitian ini diperoleh lima fragmen DNA sisipan yaitu R13, R15, R24, R25 dan R26 (Gambar 1) dengan ukuran masing-masing 310 bp, 580 bp, 700 bp, 3250 bp dan 3020 bp. Kelima fragmen tersebut diberi label non radioaktif untuk selanjutnya dibuat pelacak terhadap *Salmonella* sp.

Metode pelabelan terhadap fragmen DNA tersebut menggunakan metode *random priming* dengan label *digoxigenin-dUTP*. Deteksi hasil hibridisasi dengan pelacak berlabel menggunakan analisis imunologi sistem enzim alkaline fosfatase. Dasar metoda pelabelan dengan *random priming* ini adalah pemanjangan primer yang menempel pada DNA target dengan dNTP yang dimodifikasi dan pemanjangan ini dibantu dengan enzim. Menurut Keller dan Manak (1989) metode ini sangat efektif untuk pembuatan pelacak non radioaktif karena dengan bantuan enzim, nukleotida tersebut dapat ditambahkan pada ujung 3' suatu pelacak.

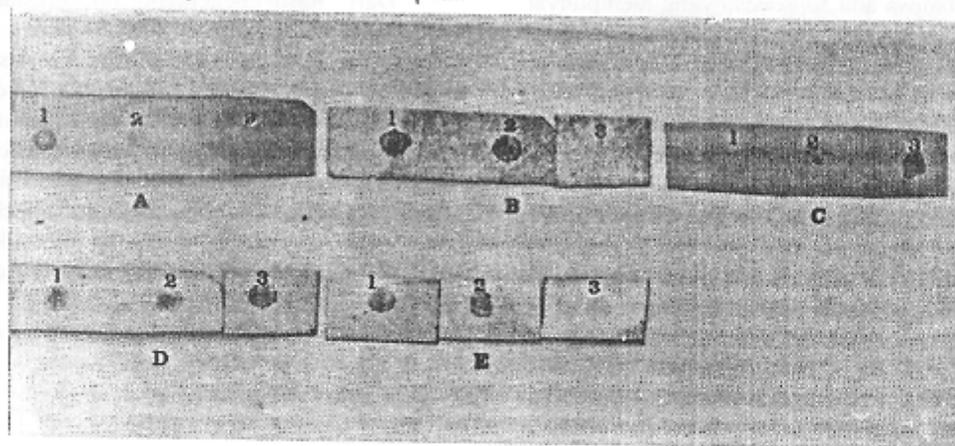
Menurut Kessler (1995) pembuatan pelacak yang ideal dibutuhkan tingkat sensitivitas yang tinggi dan juga menunjukkan spesifisitas. Dalam penelitian ini diharapkan

akan diperoleh pelacak yang spesifik terhadap *Salmonella* sp. saja dengan berdasarkan pada fragmen yang diperoleh dari *S. typhimurium* yang akan berhibridisasi dengan *Salmonella* saja dan tidak dengan yang lain.

C. Seleksi Pelacak Berlabel untuk Deteksi terhadap *Salmonella*

Pemilihan pelacak terhadap *Salmonella* yang dibuat dari fragmen DNA *S. Typhimurium* ATCC 14028 dengan cara melakukan hibridisasi koloni antara pelacak dan isolat-isolat *Salmonella* dan beberapa bakteri patogen yang lain. Kelima fragmen DNA berlabel tersebut masing-masing dihibridisasikan terhadap DNA target yang telah difiksasi pada membran nilon.

Hibridisasi dilakukan juga terhadap kontrol yang meliputi kontrol negatif (pUC 19 tanpa sisipan), kontrol positif (*S. typhimurium* ATCC 14028 dan plasmid rekombinan). Penggunaan genom *S. typhimurium* ATCC 14028 sebagai kontrol positif dikarenakan DNA pelacak diisolasi dari jasad tersebut. DNA yang telah terfiksasi dihibridisasi dengan pelacak berlabel dengan sistem enzim-*conjugate* dan hasil akhir dari deteksi akan muncul warna keunguan.



Gambar 2. Hibridisasi koloni antara pelacak berlabel yang berasal dari isolat *S. typhimurium* ATCC 14028 dengan kontrol negatif dan positif (A= pelacak R13, B= pelacak R15, C= pelacak R24, D= pelacak R25, E= pelacak R26, 1=*S. typhimurium*, 2= plasmid rekombinan, 3= pUC19)

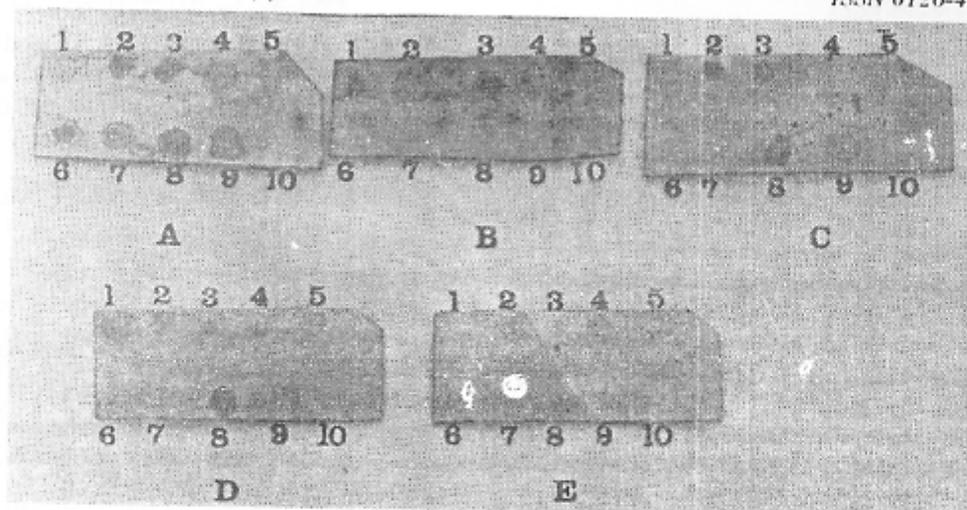
Hasil hibridisasi (Gambar 2) menunjukkan bahwa hanya R15 yang tidak mengadakan hibridisasi dengan kontrol negatif (pUC19) sedangkan untuk keempat fragmen yang lain menunjukkan hibridisasi yang positif terhadap kontrol negatif. Hal ini disebabkan untuk fragmen DNA R15 tidak ada sekuen yang sama (homolog) dengan *E. coli*, sedangkan yang lainnya masih ditemukan sekuen yang sama antara *Salmonella* dan *E. coli*. Kontrol positif yang terdiri dari *Salmonella* dan plasmid rekombinan menunjukkan kelima fragmen DNA berlabel tersebut melakukan hibridisasi dengan masing-masing isolat. Hasil hibridisasi kelima fragmen DNA berlabel dengan isolat-isolat *Salmonella* dan beberapa patogen yang lain dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fragmen R15 yang melakukan hibridisasi dengan isolat *Salmonella* dan tidak dengan bakteri patogen yang lain (*E. coli*, *Y. enterocolitica*, *V. Parahaemolyticus*). Meskipun demikian pada hibridisasi antara fragmen R15 dan *Salmonella* masih ditemukan hibridisasi negatif antara fragmen berlabel dengan *Salmonella typhi*. Hal ini kemungkinan tidak ditemukan sekuen yang sama antara kedua *Salmonella*. Hasil penelitian Liu dan Sanderson (1995) menunjukkan bahwa ada *Salmonella* yang mempunyai perbedaan genetik dengan *Salmonella* yang lain khususnya *Salmonella typhi*. Perbedaan ini disebabkan adanya perubahan pasangan basa, kesalahan replikasi, *genomic rearrangement*, adanya tambahan material genetik yang baru akibat pengaruh luar.

Untuk fragmen DNA yang masih berhibridisasi dengan *E. coli* (R24, 25, 26) dan R13 di samping dengan *E. coli* juga dengan *Y. enterocolitica*. Masih adanya hibridisasi tersebut disebabkan adanya sekuen yang sama antara

Salmonella dan kedua bakteri tersebut. Menurut Fitts (1985) adanya homologi antar DNA dari *Salmonella sp.* dan *E. coli* serta bakteri dari grup *enterobacteriaceae* dikarenakan masih adanya hubungan kekerabatan yang dekat, sehingga sekuen antara keduanya masih ada yang sama. Hasil penelitian Fitt (1985) pelacak yang dibuat dengan pemotongan Enzim *BamHI* diperoleh fragmen dengan ukuran 4,1 kb dan 4,9 kb, fragmen tersebut berkoplementer dengan *Salmonella sp.*, tetapi masih terjadi hibridisasi dengan *E. coli*. Hasil penelitian Tsen *et. al.* (1989) yang menyempurnakan penelitian Fitt (1985), fragmen tersebut dipotong dengan enzim *HindIII* sehingga diperoleh fragmen dengan ukuran 1,8 kb dan menunjukkan hasil bahwa fragmen tersebut setelah dilabel hanya berhibridisasi dengan *Salmonella sp.* dan tidak berhibridisasi dengan yang lain. Hasil tersebut dapat dilihat dengan semakin kecil fragmen DNA akan lebih mudah dan cepat melakukan hibridisasi dibandingkan dengan fragmen yang lebih panjang (Lamb and Birni, 1995; Old and Primrose, 1989; Kirby, 1990).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini diketahui hanya ada satu fragmen DNA dari *S. typhimurium* yang dapat melakukan hibridisasi terhadap beberapa isolat *Salmonella sp.* dan tidak dengan bakteri patogen yang lain (*E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*). Fragmen DNA yang mempunyai spesifisitas terhadap isolat *Salmonella sp.* tersebut mempunyai ukuran 580 bp yang dihasilkan dengan pemotongan enzim *BamHI* dan *HindIII*.



Gambar 3. Hibridisasi koloni antara pelacak yang berasal dari isolat *S. typhimurium* ATCC 14028 dengan isolat *Salmonella* dan patogen yang lain (A=pelacak R13, B= pelacak R15, C= pelacak R24, D= pelacak R25, E= pelacak R26, 1= *Salmonella* Sp. FNCC 134, 2= *Salmonella* sp. FNCC 97, 3= *Salmonella* sp. FNCC 146, 4=*Salmonella* sp. FNCC 139, 5= *Salmonella typhi*, 6= *Salmonella* sp. FNCC 142, 7= *Y. enterocolitica*, 8= *E. coli* JCM 7577, 9= *E. coli* FNCC 91, 10= *V. parahaemolyticus*)

Daftar Pustaka

- Adams, R. L. P., J. T. Knowler, and D. P. Leader. 1986. The biochemistry of the nucleic acids. 10th ed., Chapman and Hall, London, p. 145-165.
- Anonimus. 1995. The DIG system user's guide for filter hybridization. Boehringer - Mannheim, Germany.
- Brown, T. A. 1986. Gene Cloning An Introduction. Van Nostrand Reinhold United Kingdom.
- FDA. 1995. Bacteriological analytical manual. 8th ed. Food and Drug Administration, Assosiation of Analytical Chemist, Arlington, V.A.
- Fitts, R. 1985. Development of DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. *J. Food Tech.* 39 (3) p: 95-102.
- Flowers, R. S. 1985. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. *J. Food Tech.* 3 p: 103-105.
- Flowers, R. S., M. A. Mozola, M. S. Curiale, D. A. Gabis, and J. H. Silliker. 1987. Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Sci.* 52 (3). p: 781-785.
- Keller, G. H. and M. M Manak. 1989. DNA Probes. Macmillan Publisher Ltd. New York.
- Kessler, C. 1995. Non-radioactive labelling and detection of nucleic acid probes. In: Gene Probes 1. A Practical Approach, Hames and Higgins (eds) IRL Press at Oxford University Press. New York-Tokyo. p: 93-144.
- Kirby, L. T. 1990. DNA Fingerprinting An Introduction. Stockton Press. New York. p: 135-145.
- Lamb, R. F. and G. D. Birnie. 1995. Strategies for using gene probes. In: Gene Probes 1. A Practical Approach, Hames and Higgins (eds) IRL Press at Oxford University Press. New York-Tokyo. p: 1-15.

- Liu, S. L. and K. E. Sanderson. 1995. Genomic cleavage map of *Salmonella typhi* Ty2. J. Bacteriol. 177(17). p : 5099-5107
- Mattingly, J. A., and W. D. Gehle. 1984. An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. J. Food Sci. 49. p : 807-809.
- Mattingly, J. A., B. J. Robison, A. Boehm, and D. W. Gehle. 1985. Use of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella* in foods. J. Food Tech. 3. p : 90-94.
- Old, R. W. and S. B. Primrose. 1989. Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering. Blackwell Scientific Publication. Oxford-London.
- Rose, E. B., B. Bennet, and A. Okrend. 1987. Comparison of culture methods and the DNA hybridization test for detection of *Salmonella* in ground beef. J. Food Sci., 52. p : 1726-1727.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Swaminathan, J. A. G. Aleixo, and S. A. Minnich. 1985. Enzyme immunoassays for *Salmonella*: One-day testing is now a reality. J. Food Tech. 3. p : 83-89.
- Tsen, H., M. Chen, J. Shieh, S. Wang, and N. Hu. 1989. Possible use of a 1,8 kb DNA fragmen for the specific detection of *Salmonella* in foods. J. Ferm. Bioeng. 68 (1) p : 1-6.