

SALMONELLA TYPHIMURIUM

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KIC
TKD. 06/01
Rah
p

TESIS

PERBEDAAN KOMPONEN PROTEIN SEL UTUH
BAKTERI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* YANG
DI ISOLASI DARI PENDERITA DIARE DAN DAGING
AYAM RAS.

PENELITIAN EKSPLORASI LABORATORIK



Oleh :

Dadik Raharjo

IKD – MIKROBIOLOGI
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000

PERBEDAAN KOMPONEN PROTEIN SEL UTUH BAKTERI
SALMONELLA typhimurium YANG DI ISOLASI DARI
PENDERITA DIARE DAN DAGING AYAM RAS

PENELITIAN EKSPLORASI LABORATORIK

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Oleh :

DADIK RAHARJO
NIM. 099712498/M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 15 JUNI 2000

Oleh
Pembimbing Ketua



Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., Sp.MK.
NIP. 130 676 011

Pembimbing



Prof. Atasiati Idajadi, dr., Sp.MK.
NIP. 130 128 215

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Soetjipto, dr, MS., Ph.D.
NIP. 130 687 606

Telah diuji pada :
Tanggal 5 Juli 2000

PANITIA PENGUJI TESIS

KETUA : Dr. H. Ismoedijanto, dr., Sp.A(K), DTMH

ANGGOTA : 1. Prof. Atasiati Idajadi, dr., Sp.MK.
2. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr, MS., Sp.MK.
3. Garry Cores de Vries, drh., MS., Ms.C.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahuwata'alla penulis panjatkan, karena hanya dengan limpahan rahmat dan hidayah-Nya penelitian dan penulisan tesis ini dapat terselesaikan.

Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada berbagai pihak yang telah banyak memberikan bantuan, bimbingan dan dorongan dalam penyelesaian penulisan tesis ini, yaitu kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya, yang telah memberikan ijin untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana.
2. Direktur Program Pascasarjana, Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Ketua Minat Studi Mikrobiologi yang telah memberi kesempatan untuk mengikuti program pendidikan pascasarjana S-2.
3. Dr.dr. Eddy Bagus Wasito, MS., Sp.MK dan Prof. dr. Atasiati Idajadi, Sp.MK sebagai dosen pembimbing, yang dengan penuh kesabaran telah memberikan bimbingan, tuntunan serta saran dan nasehat yang sangat berguna mulai dari perencanaan sampai pada penyelesaian penulisan tesis ini.
4. Seluruh staf kelompok studi diare, tropical disease centre-universitas airlangga yang telah banyak memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung serta kesempatan untuk melakukan penelitian dan penulisan tesis ini.

5. Keluarga tercinta yang selalu memberikan dorongan dan pengorbanan selama penulis menempuh program pendidikan S-2 di Universitas Airlangga.
6. Semua pihak yang telah banyak memberikan bantuan dalam penulisan tesis ini.

Semoga amal baik yang telah diberikan mendapat balasan yang setimpal serta selalu mendapatkan berkat dan rahmat dari Tuhan Yang Maha Esa.

Penulis berharap semoga hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangan informasi bagi pengembangan ilmu dan bagi masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Mei 2000

Penulis

RINGKASAN

Penyakit salmonellosis merupakan salah satu masalah kesehatan di seluruh dunia. *Salmonella typhimurium* merupakan salah satu penyebab penyakit salmonellosis yang bersifat zoonosis. Sumber penularan yang utama adalah hewan ternak, produk peternakan, hewan kesayangan serta hewan berdarah dingin yang berperan sebagai karier.

Keganasan dan kemampuannya beradaptasi pada berbagai macam lingkungan dari bakteri *S.typhimurium* ini sangat dipengaruhi oleh adanya lokus gen, pathogenicity islands dan plasmid yang hanya terdapat pada organisme yang patogen.

Komponen protein sel utuh bakteri *Salmonella* spp. sangat dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu : terdapatnya gen atau segmen kromosom tertentu dan pengaruh lingkungan yang merangsang sekresi protein tertentu. Protein yang disekresikan oleh bakteri ini berperan dalam proses pathogenitas, adaptasi terhadap lingkungan maupun terkait dengan mekanisme resistensi dari bakteri terhadap beberapa antimikroba.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya perbedaan komponen protein sel utuh dari *S. typhimurium* terhadap isolat yang diisolasi dari tinja anak penderita diare dan isolat dari daging ayam. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan yang hasilnya diharapkan dapat memberikan dasar bagi

pengembangan penelitian selanjutnya, misalnya : Pengembangan metode yang mudah, murah dan terpercaya untuk survey epidemiologi guna penentuan sumber wabah penyakit, pembuatan marker komponen protein dari *S.typhimurium* strain yang patogen, pemilihan protein untuk produksi antibodi monoklonal.

Dalam penelitian ini dilakukan perbandingan komponen protein sel utuh bakteri *S. typhimurium* isolat tinja anak penderita diare dan isolat daging ayam, yang telah diuji secara biokimiawi dan serologi, dan menunjukkan bahwa kedua macam isolat adalah identik. Uji kepekaan terhadap beberapa macam antimikroba dilakukan untuk memberikan tambahan informasi sifat resistensi dari bakteri yang mungkin dapat berperan dalam typing bakteri

Komponen protein sel utuh bakteri *S.typhimurium* isolat H-1 (dari tinja anak penderita diare) berbeda dengan ketiga isolat lainnya (H-2, M-1, DS-9) dan komponen protein sel utuh bakteri yang berbeda ini mempunyai berat molekul yang besar pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE.

Uji kepekaan isolat bakteri terhadap beberapa macam antimikroba ternyata tidak memberikan pola yang spesifik sehingga uji kepekaan terhadap antimikroba hanya mempunyai kegunaan yang sangat terbatas jika digunakan untuk typing bakteri.

Perlakuan sonikasi untuk memecah sel bakteri ternyata memberikan manfaat yang baik pada teknik SDS-PAGE untuk analisis komponen protein, hal ini dapat terlihat dengan hasil gambaran pemisahan protein yang lebih tajam dibandingkan dengan hasil SDS-PAGE dari sampel yang tidak dilakukan sonikasi terlebih dahulu.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa terdapat perbedaan komponen protein dari isolat H-1 (tinja anak penderita diare) dengan isolat lainnya (H-2, M-1, DS-9) dengan teknik SDS-PAGE, walaupun secara biokimia dan serologi keempat isolat tersebut adalah identik.

ABSTRACT

Salmonellosis is recognized to be a serious public health disease problem, affecting more people and animal than any disease problem. *Salmonella* is capable of causing a variety of disease syndromes : enteric fever, bacteremia, enterocolitis and focal infection.

The virulence properties in *S. typhimurium* are often mediated by genes contained within pathogenicity islands, i.e., large, unstable segments of the chromosome. Virulence plasmid and *Inv* locus are also important in virulence of bacteria

Environment stress affected *S. typhimurium* protein components. There is an accumulation of glutamate in response to osmotic stress and production of specific outer membrane protein were induced by acid adaptation.

Four *S. typhimurium* isolates are identical each other by biochemistry and serological tests, two isolates came from diarrheal stool children (H-1 and H-2) and two remaining came from chicken meat (M-1 and DS-9), respectively. Whole cells protein analysis were done by SDS-PAGE with 7,5 % acrylamide gel concentration. The result showed that *S. typhimurium* H-1 isolate (from diarrheal stool children) had components protein differences with another isolates (H-2., from diarrheal stool sample, M-1 and DS-9, both came from chicken meat).

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	vi
ABSTRAK.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR FOTO.....	xiii
I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.4. Manfaat Penelitian	7
II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Taxonomi <i>Salmonella</i>	8
2.2. <i>Salmonella typhimurium</i>	10
2.3. Epidemiologi	10
2.4. Struktur Antigen <i>S. typhimurium</i>	12
2.5. Cara Infeksi dan Penularan <i>Salmonella</i> spp.	13
2.6. Mekanisme Kolonisasi dan Penetrasi <i>Salmonella</i> spp. di Mukosa .	14
2.7. Pengaruh Lingkungan Terhadap <i>Salmonella</i> spp.....	17
2.8. Gen dan Protein <i>Salmonella</i> yang Berperanan dalam Mekanisme Infeksi	20
III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	22
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	22
3.2. Kerangka Operasional	27
3.3. Hipotesis Penelitian	27
IV METODOLOGI PENELITIAN.....	28
4.1. Populasi dan Sampel	28
4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	28
4.3. Variabel penelitian	29
4.4. Bahan dan Alat	31
4.5. Prosedur Kerja	31

V.	HASIL PENELITIAN.....	35
5.1.	Identifikasi <i>Salmonella typhimurium</i>	35
5.2.	Pemeriksaan Komponen Protein Bakteri <i>S. typhimurium</i>	36
5.3.	Pemeriksaan Resistensi Isolat <i>S. typhimurium</i> Terhadap Berapa Antimikroba.....	39
VI.	PEMBAHASAN.....	41
VII.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
7.1.	Kesimpulan.....	54
7.2.	Saran.....	54
	DAFTAR PUSTAKA.....	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
5.1. Hasil Pemeriksaan Kepekaan <i>S. typhimurium</i> Terhadap Beberapa Antibiotik Secara In vitro Metode Difusi	40

DAFTAR FOTO

	Halaman
5.1. Foto Hasil Pemeriksaan Komponen Protein sel utuh <i>S. typhimurium</i> Dengan SDS-PAGE.....	37
5.2. Foto Hasil Pemeriksaan Komponen Protein sel utuh <i>S. typhimurium</i> Dengan SDS-PAGE Dibesarkan Pada Tempat Komponen Protein Yang Berbeda.....	38

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Penyakit salmonellosis diakui sebagai salah satu masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Sumber penularan penyakit ini berasal dari penderita yang baru sembuh atau bisa terjadi melalui termakannya makanan dan produk makanan yang terkontaminasi bakteri *Salmonella spp.* Gastroenteritis yang diakibatkan bakteri *Salmonella spp.* ini terjadi pada 50.000 kasus di Amerika Serikat (Baron *et al.*, 1994).

Salmonella spp. mampu bertahan pada empedu dengan konsentrasi yang relatif tinggi dibanding bakteri enterik lainnya, hal inilah yang berperan penting terhadap ketahanan bakteri ini pada saluran cerna (Joklik *et al.*, 1992).

Salmonella spp. merupakan salah satu bakteri penyebab diare akut terutama pada anak-anak baik di negara berkembang maupun di negara maju. Di Australia, *Salmonella spp.* merupakan penyebab terbanyak kasus diare yang disebabkan oleh bakteri. Dari 4.637 kasus diare akut yang terjadi mulai April 1980 – Maret 1993, *Salmonella spp.* ditemukan sebanyak 5,8%. (Barnes *et al.*, 1998).

Newcomb *et al.* (1997), melaporkan terjadinya wabah penyakit akibat *Salmonella spp.* pada pusat perkembangan anak Amerika di Jerman dengan *attack rate* pada anak-anak sebesar 47 % dan pada pegawainya sebesar 32 %.

Di Singapore, *Enterotoxigenic E. coli* merupakan patogen yang paling umum ditemukan pada tinja penderita anak-anak yang masuk rumah sakit, dan *Salmonella* spp. merupakan bakteri paling banyak kedua yang dapat diisolasi dari sampel yaitu 19% (Mendis *et al.*, 1995).

Saidi *et al.*, (1997), melaporkan bahwa *Salmonella* spp. merupakan agen penyebab diare terbesar kedua pada anak-anak dibawah umur 5 tahun yang bertempat tinggal di daerah pedesaan dan dirawat di rumah sakit Malindi, Kenya.

Di Amerika, 30% daging ayam, 15% daging babi dan 3% daging sapi segar yang diperdagangkan ternyata terkontaminasi oleh *Salmonella* spp. (Doyle and Cliver, 1990). Penelitian di Surabaya dengan mengambil sampel daging ayam dan daging sapi yang diperdagangkan melalui pasar tradisional dan supermarket ternyata menunjukkan bahwa 36% daging ayam dan 27,5% daging sapi yang diperdagangkan terkontaminasi oleh *Salmonella* spp. (Lindawati dkk., 1997).

Beberapa peneliti lainnya melaporkan bahwa 1/3 daging ayam yang diperdagangkan terbukti positif mengandung *Salmonella* spp. dan daging ayam merupakan media yang terpenting untuk terjadinya penularan *Salmonella* spp. ke manusia (Jay, 1986).

Habitat utama dari *Salmonella* spp. adalah saluran cerna manusia dan hewan, seperti burung, reptil, ternak, dan kadang-kadang dapat ditemukan pada insekta. Walaupun habitat utama pada saluran pencernaan, bakteri ini dapat ditemukan pada bagian tubuh lainnya seperti limpa, hati, empedu kelenjar limfa

usus dan diafragma. *Salmonella* spp. keluar bersama feses dan dapat menyebar melalui serangga ketempat yang luas (Jay. 1986).

Salmonella spp. di dalam saluran cerna akan menginvasi epitel bagian superfisial, menyebabkan kerusakan sel dan pada serotipe tertentu (*Salmonella typhi* dan *S. choleraesuis*) dapat masuk ke pembuluh darah dan menimbulkan bakteriemia yang ditandai dengan demam, sakit kepala, muntah dan kadang-kadang konstipasi (Baron *et al.*, 1994).

Empat faktor yang berpengaruh besar terhadap terjadinya wabah salmonellosis adalah, perubahan temperatur, pengolahan yang kurang baik, pemakaian bahan baku yang sudah terkontaminasi dan terjadinya kontaminasi silang (Doyle and Cliver, 1990).

Komponen protein *Salmonella* spp. sangat dipengaruhi oleh lingkungan bakteri, seperti dilaporkan oleh Leyer and Johnson (1993), bahwa lingkungan berpengaruh terhadap komponen protein dari *Salmonella typhimurium*. Pada suasana asam pada bakteri ini akan didapatkan suatu protein membran luar yang khusus.

Botsford *et al* (1994), melaporkan adanya peningkatan kadar glutamat pada *Salmonella typhimurium* yang mendapat stress akibat tekanan osmotis.

Khan *et al.* (1996), melaporkan keberhasilan penggunaan teknik pemeriksaan komponen protein dari sel bakteri utuh guna melakukan typing protein yang berperan untuk melacak sumber terjadinya infeksi.

Kasus salmonellosis di Amerika dari tahun 1963 sampai 1988 meningkat sebesar dua kali lipat lebih dan diperkirakan hanya 30% dari kasus sesungguhnya

yang dilaporkan sehingga diperkirakan setiap tahun terjadi 4,8 juta kasus salmonellosis (Doyle and Cliver, 1990).

Penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* spp. secara umum disebut dengan "Salmonellosis". Ada tiga gejala berbeda yang terjadi pada manusia akibat infeksi *Salmonella* spp. dengan spesies yang berbeda. Gejala yang paling parah adalah demam tyfoid, akibat *S. typhi*, Gejala yang lebih ringan adalah demam enteric akibat dari *S. paratyphi* A, B dan C serta gejala yang paling ringan adalah gejala keracunan makanan akibat *Salmonella* spp. selain spesies diatas (Doyle and Cliver, 1990).

Pemeriksaan sumber infeksi sangat penting untuk diketahui secara pasti agar dapat dilakukan tindakan pencegahan dan pemberantasan penyakit sehingga dapat dicegah terjadinya penyebaran ke masyarakat luas.

Baron *et al.* (1994), menyatakan bahwa sistim ideal yang dipilih untuk penentuan sumber infeksi dengan cara penentuan strain mikroba haruslah merupakan sistim yang sudah terstandarisasi, dapat diulang, sensitif, stabil, mudah didapat, murah, dapat digunakan untuk bermacam-macam mikroorganisme dan telah teruji kehandalannya dalam penelitian epidemiologi. Tidak ada sistim yang dapat memenuhi kriteria tersebut secara sempurna tetapi yang penting adalah kita mengetahui keunggulan dan kelemahan dari masing-masing sistim yang dipilih untuk digunakan dalam penelitian epidemiologi

Metode typing dapat dilakukan secara biologi atau biokimiawi (biotype), pola sensitivitas terhadap antimikroba (antibiogram) dan typing secara serologi (serotype) yang merupakan metode typing sederhana dan mudah untuk

dilaksanakan oleh banyak laboratorium tetapi cara ini tidak sehandal metode molekular yang terbaru.

Typing bakteriosin (meliputi sensitivitas terhadap bakteriosin maupun kemampuan menghasilkan bakteriosin), typing bakteriofage (phage typing) serta analisis plasmid atau genom (kromosom dan plasmid) dari asam nukleat merupakan teknik yang sangat terpercaya tetapi hanya dapat dilaksanakan oleh laboratorium tertentu mengingat peralatan maupun reagensinya yang mahal serta memerlukan penanganan yang khusus (Baron *et al.*, 1994).

Bahan-bahan yang diperlukan untuk analisis kromosom dan plasmid dari 50 sampel diketahui berharga cukup mahal, diantaranya adalah enzim taq polymerase (100 unit = US \$ 83), primer (0,1 unit = US \$ 34), d NTP mix (0,5 ml = US \$ 44), restriction endonucleases (100 unit = US \$ 30) PCR marker (250 ul = US \$ 83) streptavidin-peroxidase conjugate(1 mg = US \$ 150) harga-harga berlaku untuk Amerika dan harus ditambahkan biaya pengiriman, bahan harus diimport secara khusus dan harus disimpan secara khusus (-30 sampai - 80°C) agar potensinya tidak menurun secara drastis (Anonimus, 1995., Kamerbek *et al.* 1995., Ausubel *et al.* 1995., Kirby, 1992).

Penelitian epidemiologi dalam suatu wabah penyakit sangat penting dilakukan dalam rangka pemberantasan dan pencegahan meluasnya wabah yang telah terjadi. Sistem yang digunakan dalam penelitian ini haruslah cukup handal tetapi harus berbiaya murah dan dapat dilakukan oleh kebanyakan laboratorium di Indonesia sehingga memungkinkan untuk dilaksanakan.

Secara *invitro*, *Salmonella* spp. mampu tetap tumbuh pada pH 4,5 dengan kepadatan bakteri yang rendah (log 1,7 – 2,6 per ml) atau terjadi hambatan yang minimum dalam suasana asam pH 2,5 jika bakteri mempunyai kepadatan yang tinggi (log 7 – 8 per ml). Strain *Salmonella* spp. yang diisolasi dari manusia, telur dan bahan makanan lainnya ternyata mempunyai ketahanan terhadap asam yang berbeda-beda (Ruzickova, 1996).

Humphrey *et al.* (1993), melaporkan terjadinya peningkatan kemampuan toleransi terhadap panas dan asam serta tidak terjadi gangguan sintesis protein pada *Salmonella enteridis* jika dilakukan peningkatan temperatur dari 20°C menjadi 37 dan 46°C dalam waktu 5 – 15 menit.

Pemeriksaan protein hanya menggunakan bahan-bahan kimia seperti acrylamid, temed, ammonium persulfat dan buffer yang kesemuanya berharga relatif murah dan dapat disimpan untuk jangka waktu lama dalam suhu kamar saja (Ausubel *et al.* 1995).

Pemeriksaan komponen protein dari seluruh sel bakteri relatif lebih mudah dan murah dibanding pemeriksaan asam nukleat yang memerlukan peralatan dan reagen khusus. Hasil pemeriksaan protein sel bakteri utuh ternyata dapat digunakan sebagai typing guna menentukan sumber terjadinya infeksi (Khan *et al.* 1996).

1.2. Rumusan Masalah.

1. Apakah terdapat perbedaan komponen protein sel utuh dari *Salmonella typhimurium* yang diisolasi dari penderita diare dan daging ayam ras.
2. Apakah penggunaan teknik SDS – PAGE mampu mendeteksi perbedaan komponen protein sel utuh dari *Salmonella typhimurium* yang diisolasi dari penderita diare dan daging ayam ras.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Penentuan pola gambaran komponen protein sel utuh *Salmonella typhimurium* dari penderita diare dan dari daging ayam ras.
2. Mengevaluasi kemampuan pemeriksaan komponen protein sel bakteri utuh dengan cara SDS – PAGE.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Penelitian pendahuluan guna mengisolasi komponen protein sel utuh dalam rangka pembuatan antibodi monoclonal.
2. Memberikan informasi tentang penggunaan teknik analisis komponen protein sel utuh dalam rangka typing guna penentuan sumber *S. typhimurium*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Taxonomi *Salmonella* spp.

Menurut Bergey's manual of determinative bacteriology edisi 9 (1994), untuk tujuan praktis, bakteri dapat dibagi menjadi empat kelompok utama : 1). Eubakteria Gram negatif yang mempunyai dinding sel, 2). Eubakteria Gram positif yang mempunyai dinding sel, 3). Eubakteria tanpa dinding sel dan 4). Archaeobakteria. Keempat kelompok utama ini dibagi menjadi 35 group. Genus *Salmonella* spp. adalah anggota family *Enterobacteriaceae*, subgroup 1 dari group 5 yang merupakan bakteri berbentuk batang Gram negatif dan fakultatif anaerob (Holt *et al.*, 1994).

Joklik *et al* (1992), menyatakan bahwa taxonomi *Salmonella* spp. banyak ragamnya karena perkembangan dan penggunaan beberapa *nomenclature* yang berbeda. Skema antigenik dari Kauffman-White menghasilkan lebih dari 2000 spesies dari *Salmonella* spp. sebab masing-masing tipe antigenik yang ditemukan diberi nama, seperti *Salmonella typhimurium*. Ewing dkk. Membagi *Salmonella* spp. menjadi tiga spesies saja yaitu : 1). *S. choleraesuis*. 2). *S. enteridis* dan 3). *S. typhi*. Menggunakan skema Ewing ini, *S. typhimurium* dari skema Kauffman-White dapat disebut *S. enteridis* serotype *typhimurium*.

Berdasar pola antigenik dengan menggunakan O antigennya, spesies dan serovar *Salmonella* spp. dapat dikelompokkan menjadi : group A, B, C₁, C₂, D

dan E₁. Pengelompokan ini berdasar kesamaan kandungan dari satu atau lebih dari antigen O (Jay, 1986).

Berdasar penggunaan teknik DNA hibridisasi hanya ada satu spesies yaitu *S. enterica*. *S. enterica* ini dapat dikelompokkan menjadi enam subgroup yaitu : Subgroup 1 adalah subspecies *enterica*, Subgroup 2 subspecies *salamae*, Subgroup 3a subspecies *arizonae*, Subgroup 3b subspecies *diarizonae*, Subgroup 4 subspecies *houtenae*, Subgroup 5 subspecies *bongori* dan Subgroup 6 subspecies *indica*. *Salmonella typhimurium* secara taxonomi ini secara lengkap menjadi *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotipe *typhimurium* atau secara umum sering disebut *Salmonella* serotipe *typhimurium* (Joklik *et al.*, 1992)

Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa genus *Salmonella* adalah bakteri yang berbentuk batang lurus, berukuran 0,7-1,5 X 2-5 um, Gram negatif, umumnya motil dengan terdapatnya flagella peritrichous, fakultatif anaerob. Chemoorganotrophic, mempunyai metabolisme tipe respiratorik dan fermentasi secara bersamaan. Temperatur pertumbuhan yang optimal adalah 37°C, D-Glukosa dan karbohidrat lainnya dikatabolisme menjadi asam dan gas.

Sifat-sifat biokimia dari *Salmonella* spp. adalah : oksidase negatif, katalase positif, indole dan Voges-Proskauer negatif, methyl red dan Simmons citrat positif. Lysine dan ornithine decarboxylase positif, reaksi arginine dihidrolase adalah bervariasi. Memproduksi H₂S, tidak menghidrolasi urea, tumbuh pada KCN dan dapat menggunakan malonate secara bervariasi dan mereduksi nitrat dan bakteri ini memfermentasi karbohidrat , termasuk L-arabinosa, maltosa, D-mannitol, D-mannosa, L-rhamnosa, D-sorbitol, trehalosa, dan D-xylosa.

Sitrat digunakan sebagai sumber karbon yang utama, tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa serta dapat tumbuh pada kondisi aerobik dan anaerobik (Baron *et al.*, 1994).

2.2. *Salmonella typhimurium*

Holt *et al.* (1994), menyatakan bahwa *S. typhimurium* terdapat secara luas dan sering bertindak sebagai penyebab infeksi pada manusia dan hewan serta salah satu serotipe yang sering menjadi penyebab gastroenteritis akibat *Salmonella* spp. pada manusia.

Berdasar skema Kaufmann dengan melihat karakteristik biokimiawinya, genus *Salmonella* spp. dapat dibagi menjadi lima sub genus, yaitu : sub genus I, II, III, IV dan V. Sub genus I terdiri dari *S. choleraesuis*, *S. paratyphi-A*, *S. paratyphi-B*, *S. paratyphi-C*, *S. typhi*, *S. enteridis*, *S. gallinarum* dan *S. typhimurium*. Karakteristik biokimiawi dari sub genus I adalah : β -galactosidase (ONPG test) (-), produksi asam dari laktosa (-), dulcitol (+), mucate (+), galacturonate (-), penggunaan dari malonat (-), d-tartrate (+), gelatin hydrolysis (film method) (-), tidak tumbuh dengan terdapatnya KCN dan hanya terdapat pada hewan-hewan berdarah panas (Holt *et al.*, 1984).

2.3. Epidemiologi.

Salmonella spp. diketahui sebagai penyebab banyak macam penyakit manusia seperti gastroenteritis (termasuk diare), demam typhoid dan dapat menyebar melalui darah. Salmonellosis merupakan salah satu penyakit infeksi

yang terbanyak dengan jumlah kasus yang dilaporkan di Amerika Serikat berkisar 48 ribu pertahun, tetapi jumlah yang sesungguhnya diperkirakan dapat mencapai 2 juta orang karena tidak semua kejadian gastroenteritis dilaporkan. Semua serotipe *Salmonella* spp. dapat menimbulkan penyakit (Doyle and Cliver, 1990).

Salmonella typhimurium merupakan penyebab penyakit gastroenteritis yang utama di Amerika dan juga paling banyak diketemukan pada ternak. Sumber utama penularan adalah hewan ternak, hewan-hewan kesayangan (anjing dan kucing) serta hewan berdarah dingin dapat bertindak sebagai karier dalam penularan *Salmonella* spp.. Manusia yang menderita gastroenteritis dapat bertindak sumber penularan karena penderita dapat mengeluarkan bakteri untuk beberapa minggu setelah sembuh dari penyakit. Pemberian antibiotik pada gastroenteritis karena *Salmonella* spp. dapat memperpanjang kondisi karier dari pasien (Joklik *et al.*, 1992., Woodward *et al.*, 1997).

Threlfall *et al.* (1993), melaporkan adanya kenaikan tingkat resistensi dari *S. typhimurium* terhadap antibiotik sampai dua kali lipat. Peningkatan resistensi ini terjadi pada isolat *S. typhimurium* dari manusia maupun hewan ternak.

Kejadian peningkatan resistensi terhadap antibiotika ini juga terjadi pada isolat yang berasal dari daging ayam broiler sehat. Sebanyak 57% isolat resisten terhadap satu macam antibiotik dan 45% terjadi resistensi terhadap dua macam atau lebih antibiotik (Lee *et al.*, 1993).

Air pencuci, serangga dan binatang pengerat yang telah terkontaminasi bakteri *S. typhimurium* dapat mengkontaminasi daging ayam mentah maupun matang (Jay, 1986).



2.4. Struktur antigen *Salmonella typhimurium*

Jay, (1986), menyatakan bahwa analisis antigenik lengkap dari *Salmonella typhimurium* menghasilkan jenis antigen sebagai berikut : O antigen 1, 4, 5 dan 12, H antigen fase I adalah i dan fase 2 adalah 1 dan 2 (*S typhimurium* 1, 4, 5, 12, i, 1, 2).

Antigen O dan H adalah antigen utama yang digunakan dalam pengelompokan serotype *Salmonella* spp.. Antigen O adalah mirip dengan antigen dari Enterobacteriaceae lainnya, sedangkan antigen H adalah berbeda. Antigen H bisa terdapat dalam salah satu dari dua fase antigenic utama, fase 1, merupakan fase spesifik dan mirip dengan sedikit antigen dari organisme lainnya serta hanya bereaksi dengan antisera yang homolog, sedangkan fase 2 adalah mirip dengan antigen dari banyak organisme lainnya serta bereaksi dengan antisera heterolog (Joklik *et al*, 1992).

Roth *et al.*, (1995), menyatakan bahwa bakteri Gram negatif berbeda dengan bakteri Gram positif dan sel mammalia karena memiliki secara bersamaan membran dalam dan membran luar yang terdiri dari dua lapis lemak dan protein transmembran. Lapisan luar dari membran luar mengandung lemak spesifik, terutama sejumlah besar molekul amphofilik, lipopolysaccharide (LPS). LPS berfungsi sebagai penghalang bagi logam berat, bahan-bahan perusak lemak, misalnya garam-garam empedu, molekul-molekul yang besar seperti enzim penghancur DNA. LPS juga mengandung suatu karbohidrat sangat bervariasi (O antigen) yang dapat menurunkan pengikatan komplemen dan menghasilkan struktur yang beragam untuk host dari berbagai strain, sehingga menyebabkan

organisme menjadi lebih tahan terhadap mekanisme pertahanan tubuh yang dilakukan oleh serum.

Kemampuan *Salmonella* spp. untuk menempel pada sel reseptor host dan bertahan secara intra selluler terkait dengan adanya rantai samping dari antigen O atau pada *S. typhi* terkait dengan terdapatnya Vi antigen. Koloni *Salmonella* spp. yang kasar merupakan kelompok yang O antigennya tidak mempunyai rantai samping khusus, sehingga tidak ganas. Sebaliknya pada koloni yang halus, merupakan koloni *Salmonella* spp. yang ganas (Joklik *et al.*, 1992).

2.5. Cara infeksi dan Penularan *Salmonella* spp.

Penularan *Salmonella* spp. pada manusia secara umum terjadi akibat mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi, tetapi dapat juga terjadi penularan secara langsung dari manusia ke manusia lainnya atau dari hewan ke manusia. Sumber penular yang paling sering berasal dari daging sapi, daging ayam dan telur (Darwin and Miller, 1999).

Doyle and Cliver (1990), menyatakan bahwa daging ayam merupakan makanan yang dilaporkan paling sering bertindak sebagai sumber untuk terjadinya penyakit salmonellosis. Ayam dapat bertindak sebagai pembawa bakteri *Salmonella* spp. karena bibit ayam sudah tertular dari induknya, makanan ayam yang berprotein tinggi dan terkontaminasi bakteri ini dapat berperan sebagai penyebar bagi ayam lainnya. Tahap yang paling menentukan untuk terjadinya kontaminasi pada daging ayam adalah sewaktu ayam dilakukan pemotongan akan

terjadi kontaminasi silang akibat bertumpuknya daging ayam atau karena kontaminasi melalui tangan pekerja yang telah tercemar bakteri ini.

Salmonellosis akibat makanan ini terus meningkat angka kejadiannya, hal ini akibat : 1). Peningkatan pengolahan makanan secara massal, sehingga memudahkan penyebaran *Salmonella* spp. 2). Metode penyimpanan makanan yang kurang baik. 3). Peningkatan konsumsi daging mentah atau pengolahan yang kurang mencukupi dan 4). Peningkatan perdagangan internasional (Jay, 1986).

Lingkungan saluran cerna manusia sangat berbeda dengan lingkungan pada daging ayam ras, sehingga pertumbuhan bakteri *Salmonella* spp. juga akan menghasilkan perbedaan tertentu untuk penyesuaian terhadap lingkungannya. Saluran cerna manusia mempunyai sistem pertahanan non-imunologi dan sistem pertahanan imunologik (Soeparto dkk., 1997). Daging ayam ras merupakan media yang sangat baik untuk pertumbuhan *Salmonella* spp. karena tersedianya nutrisi, kadar air mencukupi dan tidak terdapat substansi penghambat (Soeparno, 1992).

2.6. Mekanisme kolonisasi dan penetrasi *Salmonella* spp. di mukosa.

Soeparto dkk. (1997), menyatakan bahwa pada permukaan mukosa mempunyai beberapa mekanisme sebagai pertahanan yang mencegah bakteri mengadakan kolonisasi dan penetrasi kedalam mukosa, termasuk diantaranya adalah mekanisme non spesifik yang efektif terhadap berbagai bakteri. Mekanisme ini termasuk aksi pembersihan dari cilia epitel yang mengeluarkan bakteri yang terperangkap pada cairan mukus dan mekanisme yang kontinyu dari

peristaltik dari lambung dan usus yang mampu mempercepat pengeluaran bakteri dari saluran intestinal.

Flora normal pada saluran pencernaan berperan penting dalam penghambatan kolonisasi dari bakteri patogen pendatang. Mekanisme penghambatan ini dapat terjadi melalui beberapa cara, misalnya flora normal dapat mencegah perlekatan dengan mengambil reseptor yang sama dengan bakteri patogen, kompetisi dalam mendapatkan makanan, produksi metabolit yang berperan sebagai antimikroba (Finlay and Siebers, 1995. *dalam* Roth *et al.*, 1995).

Finlay and Siebers (1995) *dalam* Roth *et al.*, (1995), menyatakan bahwa mekanisme pertahanan seluler juga berperan penting, diantaranya makrofage, leukosit polimorfonuklear serta beberapa faktor antibakterial dikeluarkan ke permukaan mukosa. Bahan yang dikeluarkan ke permukaan mukosa diantaranya adalah : imunoglobulin A, lysosim, laktoferin, dan beberapa peptida yang berperan sebagai antibakteri. *Salmonella* spp. mampu menembus lapisan mukus yang tebal karena kemampuan motilitasnya sehingga mampu mengadakan penetrasi pada epitel sel.

Salmonella typhimurium menempel pada sel jaringan usus dengan bantuan beberapa tipe dari fimbriae atau pili. Secara genetis telah dapat ditentukan tipe fimbriae yang berperan dalam mekanisme ini, yaitu : fimbriae tipe 1 (Fim), Plasmid encoded (PE) fimbriae, long polar (LP) fimbriae dan thin aggregative fimbriae (curli). Secara *in vitro* *S. typhimurium* mampu merangsang migrasi transepitel dari neutrophil dan diperkirakan bahwa fimbriae berperan penting pada proses pengumpulan neutrophil ketempat infeksi (Darwin and Miller, 1999).

Zierler and Galan (1995) dalam Roth *et al.* (1995), menyatakan bahwa penetrasi *Salmonella* spp. dalam sel meliputi pengaturan kembali cytoskeletal yang akan menyebabkan perubahan dramatis pada membran plasma di titik dimana terjadi kontak langsung antara bakteri dan sel host. Sejumlah besar lokus gen dibutuhkan untuk terjadinya penetrasi bakteri kedalam sel, beberapa lokus gen yang diketahui berperan di antaranya adalah lokus yang mengatur flagela dan permukaan dari polisakarida.

Kemampuan *Salmonella* spp. untuk mengadakan penetrasi pada host sel dipengaruhi oleh pertumbuhan yang stabil dan berbagai kondisi lingkungan (tekanan oksigen dan osmolaritas) diketahui akan mempengaruhi tingkatan superhelik dari DNA (Zierler and Galan, 1995 dalam Roth *et al.*, 1995).

Kemampuan virulensi dari bakteri yang patogen sering disebabkan gen yang mengandung *pathogenicity islands*, yaitu segmen besar dan tidak stabil dari kromosom yang tidak terdapat pada organisme sejenis yang nonpathogen. Dua macam *pathogenicity islands* telah terindikasi pada *Salmonella choleraesuis* serovar *typhimurium*. Pertama, disebut SPI-1, menentukan kemampuan *Salmonella* spp. untuk menembus epitel sel *mammalia* dan yang kedua, disebut SPI-2 yang dibutuhkan *Salmonella* spp. untuk bertahan hidup dalam makrofage. Kedua kromosom ini mempunyai panjang 40 kb dan nampak sebagai hasil dari pemindahan gen secara horizontal sebab kandungan GC nya lebih rendah dari gen sejenis dari *Salmonella* spp. *Pathogenicity islands* bisa bertambah atau menghilang dari kromosom bakteri sehingga pathogenitas bakteri bisa muncul atau menghilang (Ochman and Groisman, 1996).

Joklik *et al.*, (1992), menyatakan adanya kemampuan dari *Salmonella* spp. untuk menyerang sel reseptor dari host dan bertahan hidup secara intraselluler mungkin berhubungan dengan rantai samping dari antigen O atau terdapatnya Vi antigen dalam serotipe typhi. Kemampuan bertahan dari kerusakan dengan serum normal, berhubungan dengan adanya pelindung dari komplemen yang mengaktivasi lipid A dan LPS dari antigen O.

Salmonella spp. merupakan organisme yang kompleks dengan kemampuan memproduksi berbagai macam faktor virulensi, termasuk antigen permukaan, faktor yang berperan pada kemampuan menginvasi, endotoksin, cytotoksin dan enterotoksin. Kemampuan menginvasi dapat terbatas pada waktu tertentu dan host khusus selama proses perjalanan penyakit dan ini menunjukkan terdapatnya faktor virulensi hanya terdapat pada keadaan tertentu saja (Joklik *et al.*, 1992).

2.7. Pengaruh lingkungan terhadap *Salmonella* spp.

Salmonella spp. merupakan bakteri yang tersebar luas pada lingkungan, manusia, hewan berdarah panas dan dingin serta merupakan penyebab infeksi pada manusia dan banyak macam spesies hewan lainnya (Holt, *et al.* 1994).

Di Surabaya, *Salmonella* spp. merupakan salah satu anggota dari famili Enterobacteriaceae yang menkontaminasi daging ayam dan sapi berurutan sebesar 36% dan 27,5% dari sampel yang diambil di supermarket maupun pasar tradisional (Lindawati, dkk. 1997).

Karena luasnya predileksi bakteri *Salmonella* spp. ini menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan pada sifat *Salmonella* spp.,

baik akibat perlakuan dari manusia atau karena pengaruh lingkungan tempat bakteri berada. Corre, *et al.* (1996), melaporkan adanya peningkatan resistensi *Salmonella* spp. terhadap nalidixic acid antara tahun 1995 sampai 1996 dari strain yang diisolasi dari manusia maupun hewan (sapi, unggas dan babi), strain yang diisolasi dari hewan mempunyai prosentase resisten yang lebih tinggi dibanding prosentase yang resisten dari strain yang diisolasi dari manusia. Analisis dengan Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) menggunakan enzim *Hinfi* untuk analisis gen A gyrase (*gyr A*) yang dimodifikasi menggunakan filter yang dihibridisasi dan dilabel dengan fragmen 347 bp dari gen A gyrase ternyata menghasilkan suatu dendogram dengan koefisien kesamaan antara strain hewan (sapi, unggas dan babi) dengan strain dari manusia rata-rata lebih dari 80%, hal ini menunjukkan bahwa strain dari manusia kemungkinan besar berasal dari hewan, sehingga adanya peningkatan resistensi pada strain yang berasal dari hewan menimbulkan keawatiran yang mendalam untuk terjadinya peningkatan resistensi terhadap antibiotik pada manusia.

Joklik *et al.* (1992) menyatakan bahwa sejumlah organisme ini juga mengalami resistensi terhadap antibiotik oleh karena penggunaan antibiotik yang tanpa terkontrol pada ternak yang digunakan sebagai pemacu pertumbuhan. Banyak peneliti percaya bahwa organisme yang resisten ini dapat menimbulkan bahaya kesehatan dan menganjurkan mengurangi penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan.

Botsford *et al.* (1994), melaporkan adanya akumulasi glutamat pada *Salmonella typhimurium* sebagai respon terhadap adanya stres osmotik.

Salmonella spp. pada pertumbuhan eksponensial dalam suasana aerob, mempunyai kandungan intra sel ± 125 n mol / mg protein dan terjadi akumulasi glutamat sebanyak 290 sampai 430 n mol/mg protein jika sel dibiakkan pada medium minimal dengan 500 mM Na Cl, K Cl atau sukrose.

Akumulasi glutamat akibat stres osmotik ini masih tetap terjadi walaupun diberikan antibiotik penghambat pembentukan protein, pada strain yang terjadi mutasi pada sintesis glutamat ataupun diberikan methionin sulfone (suatu penghambat untuk pembentukan glutamat).

Salmonella spp. mampu beradaptasi pada suasana asam yang ringan (pH 5,8) dan kemampuan beradaptasi pada suasana asam ini berakibat peningkatan ketahanan sel bakteri terhadap berbagai stres, termasuk stres panas, garam dan sistem peroksidase yang aktif serta mempunyai ketahanan terhadap bahan yang aktif pada permukaan sel, seperti crystal violet dan polymixin B. Adaptasi terhadap asam ringan ini akan merangsang terbentuknya protein membran luar yang spesifik tetapi tidak menyebabkan perubahan pada komponen lipopolysakarida. (Leyer and Johnson. 1993).

Secara invitro, *Salmonella* spp. mampu tetap tumbuh pada suasana asam dengan pH 4,5 dengan kepadatan bakteri yang rendah (log 1,7 – 2,6 per ml) atau terjadi hambatan yang minimum dalam suasana asam pH 2,5 jika bakteri mempunyai kepadatan yang tinggi (log 7 – 8 per ml). Strain *Salmonella* spp. yang diisolasi dari manusia, telur dan bahan makanan lainnya ternyata mempunyai ketahanan terhadap asam yang berbeda-beda (Ruzickova, 1996).

Humphrey *et al.* (1993), melaporkan terjadinya peningkatan kemampuan toleransi terhadap panas dan asam serta tidak terjadi gangguan sintesis protein pada *Salmonella enteridis* jika dilakukan peningkatan temperatur dari 20°C menjadi 37 dan 46°C dalam waktu 5 – 15 menit. Sebaliknya peningkatan temperatur secara lambat (lebih dari 60 menit) akan mengganggu sintesis protein. Terjadinya ketahanan terhadap panas dan asam ini dapat dirangsang dengan melakukan paparan pendahuluan pada temperatur yang tinggi tetapi mekanisme yang terjadi pada kedua tipe stres ini adalah berbeda.

2.8. Gen dan Protein *Salmonella typhimurium* yang Berperanan dalam Mekanisme Infeksi.

Inv (lokus pada *S. typhimurium*) merupakan kelompok genes yang mengkode sekresi protein independen. Pada *S. Typhimurium* beberapa lokus yang telah berhasil diidentifikasi, diantaranya adalah : *InvA*, *InvB*, *InvC*, *InvE*, *InvF*, *InvG*, *InvK*, *InvL*, *InvM*, *InvN*, *InvO* (Zierler and Galan, 1995 dalam Roth *et al.*, 1995)

Eichelberg *et al* (1994), melaporkan bahwa kemampuan *Salmonella* spp. untuk masuk dalam sel epitel usus diatur oleh gen yang diidentifikasi sebagai lokus genetik *inv*. Penelitian secara invitro dalam kultus sel epitel diketahui bahwa lokus *inv B* dan *inv C* dan dibantu promotor T 7 ternyata menghasilkan polypeptida yang mempunyai berat molekul 15 dan 47 kDa. Pada bakteri *S. typhimurium* yang dilakukan mutasi lokus *inv C* ternyata bakteri kehilangan kemampuan untuk masuk pada kultur sel epitel sedangkan mutasi

lokus *inv B* ternyata tidak berpengaruh terhadap kemampuan menembus kultur sel epitel.

Salmonella typhimurium mempunyai plasmid virulensi yang diberi kode *rck* dan berhubungan dengan *outer membrane protein* (OMP) 17-19 kDa dari Enterobacteriaceae. OMP ini berperan dalam daya tahan yang tinggi terhadap aktivitas bakterisidal dari komplemen dan kemampuan penempelan serta invasi pada kultur sel mammalia. Substitusi satu asam amino (glysin menjadi asam aspartat) akan mengurangi kemampuan resistensi terhadap serum dan invasi pada sel eukaryot (Cirillo *et al*, 1996).

Engraber and Loos (1992), menyatakan bahwa komponen dari *S. typhimurium* yang bertanggungjawab terhadap proses agregasi pada lapisan mukosa usus adalah protein dengan berat molekul 66 kDa. Protein ini dapat bereaksi positif dengan antibodi monoklonal yang diproduksi dari heat shock protein (HSP) *Mycobacterium leprae* dengan berat molekul 65 kDa. Protein *S. typhimurium* dengan berat molekul 66 kDa ini didapat dengan cara menginkubasikan bakteri pada 50°C dan protein akan disekresikan pada supernatan.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.

Habitat alamiah dari bakteri *Salmonella* spp. adalah saluran pencernaan dari manusia dan hewan lainnya. *Salmonella* spp. dikeluarkan bersama tinja dan dapat bertahan hidup selama beberapa tahun pada tinja dan akan bertahan lebih lama jika terdapat pada tinja kering (Doyle and Cliver, 1990).

Salmonella spp. mempunyai daya tahan hidup pada temperatur 5 – 47°C, kisaran pH 4 – 9 dan beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri ini masih dapat tumbuh pada pH 3,7. Tumbuh baik pada aktifitas air (tersedianya air bebas yang besarnya dipengaruhi kelembaban relatif seimbang) 0,945-0,999 (Doyle and Cliver, 1990). *Salmonella* spp. mampu bertahan hidup pada kandungan empedu relatif lebih tinggi dibanding bakteri enterik lainnya (Joklik *et al.*, 1992) serta mempunyai pertumbuhan yang lebih baik pada suasana aerob dari pada suasana anaerob (Smulder, 1987., Soeparno, 1992).

Beberapa faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi sifat-sifat dari bakteri adalah : peningkatan ketahanan terhadap asam, kadar garam, enzim laktoperoksidase dan bahan yang merusak permukaan sel (Leyer and Johnson, 1993).

Ketahanan bakteri *Salmonella* spp. terhadap asam dipengaruhi : strain bakteri, konsentrasi dan kecepatan pemecahan asam dan jumlah sel yang terpapar oleh bahan (Ruzickova, 1996).

Respon terhadap perubahan lingkungan ini dapat berupa penumpukan asam glutamat akibat stres osmotik (Botsford et al, 1994), terbentuknya heat shock protein (HSP) dengan berat molekul 66 kDa akibat inkubasi bakteri *Salmonella* spp. pada temperatur 50°C dan diperlukan untuk agregasi pada permukaan mukosa yang mengandung cairan mukus (Engraber and Loos, 1992), terbentuknya HSP dengan berat molekul 58, 68 dan 88 kDa pada *S. typhi* yang mendapat stress panas (Tang et al, 1997), peningkatan sintesa protein independen akibat perubahan lingkungan dari rendah (20°C) menjadi 37 – 46°C (Humphrey et al, 1993) dan adaptasi terhadap lingkungan yang bersuasana asam ditandai dengan perubahan susunan permukaan sel untuk meningkatkan *homeostasis* pH intrasel (Leyer and Johnson, 1993).

Karakterisasi strain penyebab terjadinya wabah adalah penting dilakukan agar dapat diketahui sumber infeksi sehingga bisa dilakukan tindakan yang tepat dalam melaksanakan pengendalian dari penyakit salmonellosis ini.

Khan et al (1996), menyatakan bahwa analisis komponen protein dari *S. typhimurium* dengan teknik SDS-PAGE dapat digunakan sebagai typing guna penentuan sumber infeksi dan mampu membedakan strain *Salmonella* spp. yang berbeda, sedangkan dengan typing tradisional seperti serotyping dan phage typing, tidak mampu membedakan strain *Salmonella* spp. satu dengan lainnya.



Teknik Polyacrylamide gel electrophoresis dapat digunakan untuk mengetahui perubahan dari lipopolysaccharide yang berperan dalam patogenisitas dari *S. enteridis* (Petter et al, 1995).

Smulder (1987), Soeparno (1992), menyatakan bahwa daging ayam segar merupakan media yang sempurna untuk pertumbuhan *Salmonella* spp. Karena tersedianya nutrisi yang berlimpah, kadar air tinggi, pH netral serta tidak adanya mekanisme pertahanan dari sel seperti yang terjadi pada sel hidup sehingga *Salmonella* spp. yang tumbuh dan berkembang di lingkungan ini dapat dikatakan tidak terdapat faktor penghambat pertumbuhannya.

Saluran cerna manusia merupakan lingkungan yang sangat kompleks dan mempunyai beberapa sistem pertahanan terhadap infeksi bakteri. Sistem pertahanan saluran cerna terbagi menjadi dua kelompok, yaitu : a). sistem non-imunologik yang terdiri dari : pertahanan gastrik, proteolisis intestinal, peristaltik, flora usus, lapisan mukus, membran vilus makro dan b). sistem imunologik yang terdiri dari limfosit T, limfosit B, limfosit nul, sel makrofag, sel mast sel neutrofil dan sel eosinofil (Soeparto, 1997). Bakteri yang tumbuh dan berkembang pada saluran cerna ini harus mengadakan penyesuaian-penyesuaian tertentu agar tetap bertahan hidup sehingga komponen yang penyusunnya juga mengalami perubahan jenis maupun jumlahnya.

Perbedaan lingkungan pada daging ayam dan saluran cerna manusia :

Daging ayam ras :

pH	: netral
Bahan kimia	: negatif
Suhu	: suhu ruang ($\pm 29^{\circ}\text{C}$)
Tekanan osmose	: isotonis
Antibiotik	: tidak ada (minimal)

Salmonella spp tumbuh tanpa hambatan.

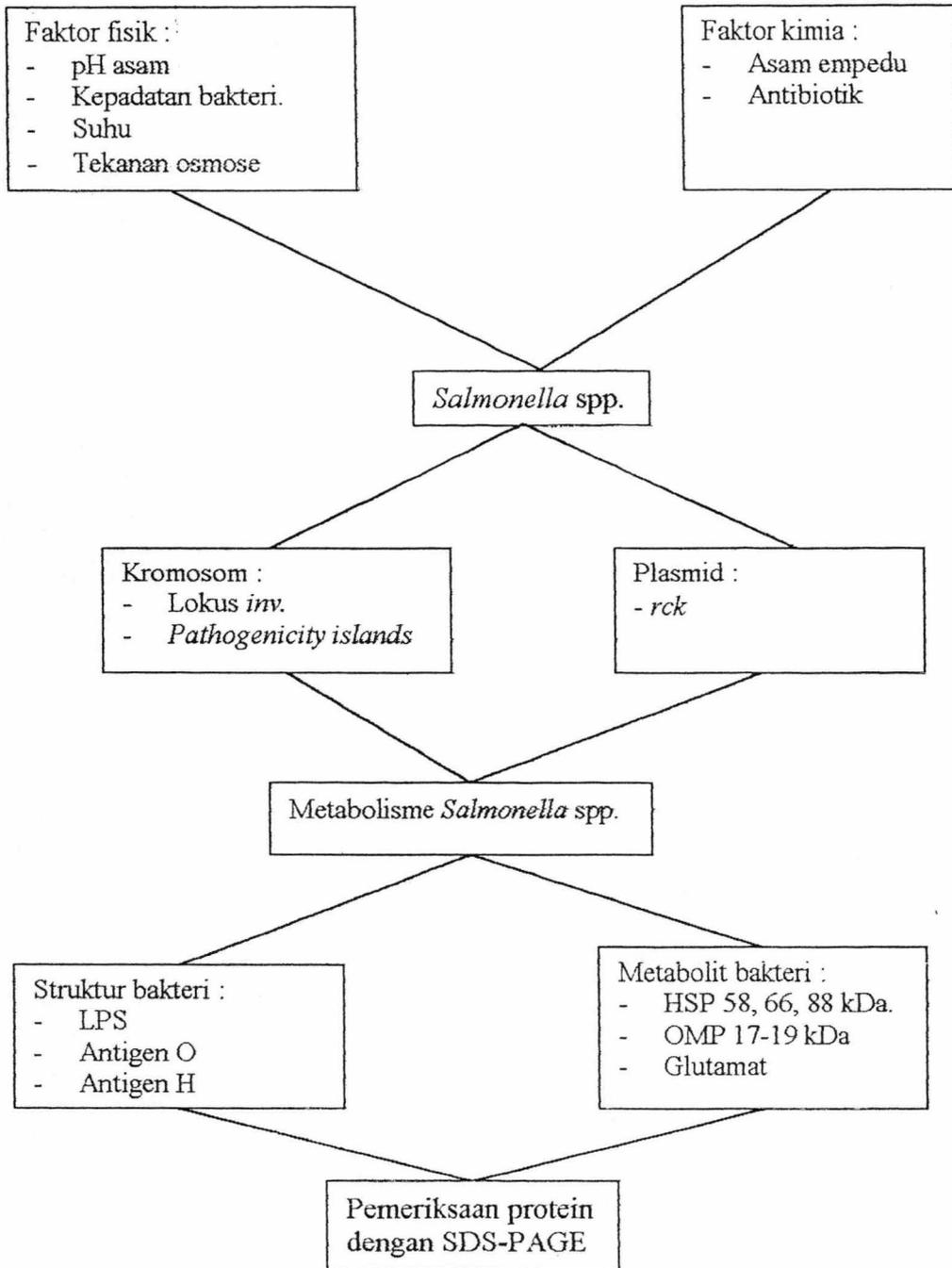
Saluran cerna manusia :

pH	: sangat asam – basa
Bahan kimia	: asam lambung, enzim proteolitik dll.
Suhu	: suhu tubuh ($\pm 37^{\circ}\text{C}$)
Tekanan osmose	: hipertonis
Antibiotik	: banyak kontak dengan antimikroba

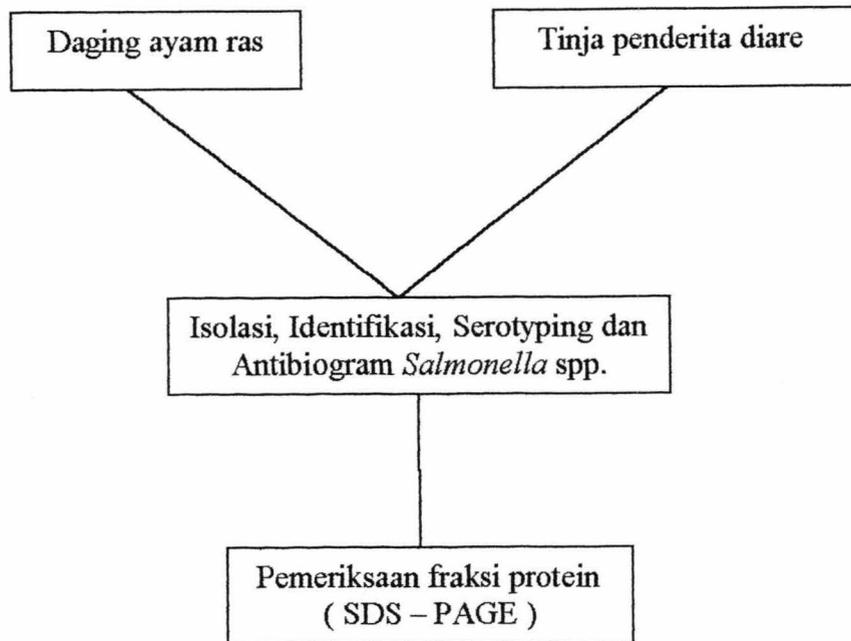
Salmonella spp. harus mengadakan penyesuaian agar tetap bisa bertahan.

Kerangka konseptual :

Faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap *Salmonella* spp.



3.2. Kerangka Operasional.



3.3. Hipotesis Penelitian.

Berdasar pada kerangka konseptual penelitian, maka diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan komponen protein sel utuh bakteri *S. typhimurium* yang diisolasi dari penderita diare dan daging ayam ras.
2. Penggunaan teknik SDS-PAGE mampu mendeteksi perbedaan komponen protein sel utuh dari *S. typhimurium* yang diisolasi dari penderita dan daging ayam ras.

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional eksploratif terhadap komponen protein bakteri *Salmonella typhimurium* yang di isolasi dari penderita diare dan daging ayam ras.

4.1. Populasi dan Sampel.

Diare merupakan salah satu gejala klinis dari infeksi bakteri *Salmonella* spp. pada manusia dan daging ayam merupakan salah satu jenis makanan yang banyak tercemari oleh *Salmonella* spp. dan dapat bertindak sebagai media dalam penularan ke manusia, maka penderita diare dan makanan ditentukan sebagai populasi, sedangkan sampel diambil dari tinja penderita diare dan daging ayam ras.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian.

Sampel tinja berasal dari anak penderita diare yang dirawat di rumah sakit DR. Soetomo, Surabaya dan daging ayam ras berasal dari daging ayam ras yang diperdagangkan di Surabaya. Isolasi, Identifikasi dan serotyping terhadap bakteri *Salmonella* spp. dilakukan di Tropical Disease Centre – Universitas Airlangga. Penelitian dan penulisan laporan dilaksanakan mulai Juli 1999 – April 2000.

4.3. Variabel penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel terikat (Dependent variable)

Variabel terikat pada hipotesis pertama (terdapat perbedaan komponen protein sel utuh bakteri *S. typhimurium* yang di isolasi dari penderita diare dan daging ayam ras) adalah adanya komponen protein yang berbeda antara isolat *S. typhimurium* satu dengan isolat *S. typhimurium* lainnya.

Variabel terikat pada hipotesis kedua (penggunaan teknik SDS-PAGE mampu mendeteksi perbedaan komponen protein sel utuh bakteri *S. typhimurium* yang di isolasi dari penderita diare dan daging ayam ras) adalah terdapatnya pita-pita protein yang berbeda dari masing-masing sampel uji.

2. Variabel bebas (Independent variable)

Variabel bebas pada hipotesis pertama adalah asal isolat bakteri *S. typhimurium*.

Variabel bebas pada hipotesis kedua adalah sonikasi pada sel bakteri.

3. Variabel kendali (control variable)

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah : jenis penyimpanan kultur bakteri , media perbanyakan sel bakteri, tekanan oksigen, temperatur pertumbuhan sel bakteri, jenis bakteri, cara pemanenan sel bakteri dan pemurnian sel bakteri.

4.3.2. Definisi operasional variabel

1. Perbedaan komponen protein sel utuh isolat bakteri satu dengan lainnya adalah terdapatnya pita protein yang menunjukkan berat molekul yang berbeda dari masing-masing isolat.
2. Isolat bakteri *S. typhimurium* adalah bakteri yang telah diidentifikasi secara biokimiawi dan serologi. Perbedaan satu isolat dengan isolat lainnya hanya darimana isolat tersebut berasal (dua isolat berasal dari tinja anak penderita diare dan dua sisanya berasal dari daging ayam ras).
3. Pemanenan dan pemurnian bakteri bertujuan untuk mendapatkan sel bakteri yang murni dalam jumlah yang banyak agar bisa dilakukan pemeriksaan lebih lanjut.
4. Penyimpanan kultur bakteri dilakukan pada temperatur kamar agar bakteri tetap mampu hidup secara normal tanpa mengalami hambatan sehingga diharapkan bakteri tidak mengalami perubahan sifat-sifatnya.
5. Komponen protein sel utuh bakteri adalah komponen protein yang berasal dari seluruh sel bakteri dan pemeriksaan dilakukan dengan teknik SDS – PAGE.
6. Sonikasi adalah suatu proses pemecahan sel bakteri menjadi bagian yang lebih kecil secara fisik dengan menggunakan gelombang ultrasonik.

4.4. Bahan dan Alat.

Bahan yang dipakai untuk penelitian ini adalah : 1). Mac.Conkey Agar, 2). KIA Agar, 3). SIM, 4). LIM, 5). Citrat, 6).VP, 7). Salmonella antiserum, 8). Tryptic Soy Broth, 9). Reagen Kovack, 10). Muller Hinton II Agar, 11). Antibiotik disk, 12). Acrylamide, 13). Bis acrylamide, 14). Tris-HCl, 15). Ammonium persulfat, 16). SDS, 17). Distilled water, 18). TEMED, 19). EDTA, 20). Protein marker, 21). Glycerol, 22). Bromofenol blue, 23). Methanol, 24). Asam acetat, 25). Coomasie blue, 26). Bovine serum albumin, 27). Phosphate-buffered saline.

Alat yang dipakai untuk penelitian ini adalah : 28). Autoclave, 29). Inkubator, 30). Jarum ose, 31). Cawan petri, 32). SDS-PAGE apparatus, 33). Spektrofotometer, 34). Kuvet, 35). Gel Dryer, 36). Polaroid foto, 37). Jangka sorong, 38). Balance, 39). H.S. Sentrifuge, 40). Incubator room, 41). Shaker.

4.5. Prosedur kerja.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap :

Tahap 1. Isolasi dan Identifikasi *S. typhimurium*

Pada tahap ini dilakukan isolasi dan identifikasi *Salmonella* spp. dari daging ayam ras dan dari tinja penderita diare. Menurut Doyle and Cliver (1990), ada lima tahapan yang secara umum dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi *Salmonella* spp. dari bahan makanan, yaitu

- 1). Dua puluh lima gram sampel makanan dimasukkan pada 100 ml pepton water 1,5% dan diinkubasi selama 24 jam.

- 2). Satu ml. suspensi bakteri dari pepton water dimasukkan pada tetrathionate broth supaya bakteri lainnya (termasuk *E. coli* dan *Shigella*) tidak tumbuh. Untuk mencegah pertumbuhan bakteri *Proteus* dapat ditambahkan novobiocin sebanyak 40 ug per ml medium. Tetrathionate broth diinkubasi pada suhu 35 – 37°C selama 16 – 24 jam.
- 3). Isolasi *Salmonella* spp. dilakukan dengan menanam suspensi bakteri dari tetrathionate broth pada permukaan Salmonella Shigella agar (SS agar modifikasi) dan diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella* spp adalah koloni yang tidak berwarna (transparan) dengan warna hitam pada pusatnya.
- 4). Koloni yang diduga bakteri *Salmonella* spp. dilakukan identifikasi dengan reaksi biokimiawi dengan cara ditanam pada KIA, SIM, LIM, VP dan citrat. *Salmonella* spp. pada KIA akan terbentuk reaksi alkali pada bagian miring dan asam pada bagian tegaknya dan terbentuk gas, gas H₂S atau tanpa terbentuk gas, pada SIM dapat diamati terbentuknya hidrogen sulfida, motility positif dan indole negatif, pada LIM dapat diamati perubahan warna yang menjadi keunguan, adanya pertumbuhan pada citrat dengan terdapatnya perubahan warna dari hijau menjadi biru dan reaksi VP negatif dengan warna medium yang kuning atau tidak berwarna serta reaksi indole negatif dengan tidak terbentuknya cincin merah muda setelah pemberian reagen kovacs.
- 5). Konfirmasi dengan uji serologi dilakukan dengan cara mengambil isolat yang telah diseleksi dengan uji biokimiawi dan direaksikan secara langsung dengan antiserum *Salmonella typhimurium* (O antigen) diatas obyek gelas. Isolat

dianggap positif *Salmonella typhimurium* jika terjadi reaksi yang positif yang ditandai dengan adanya butiran-butiran halus akibat reaksi agglutinasi. (Baron et al, 1994., Bridson, 1990., Doyle and Cliver, 1990).

Pemeriksaan sampel dari tinja penderita dapat dilakukan dengan cara menanam secara langsung pada permukaan SS agar dan selanjutnya dapat dilakukan identifikasi dengan cara yang sama dengan identifikasi bakteri yang berasal dari daging ayam ras.

Tahap 2. Perbanyak *S. typhimurium*

Khan et al (1996), menyatakan cara untuk perbanyak bakteri dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada BHI broth pada 37°C, semalam dan kemudian dipanen dengan melakukan sentrifuse pada 15.000 rpm, selama 5 menit. Sel bakteri dicuci dua kali dengan normal saline dan pelet dilarutkan lagi dalam 100 ul sampel buffer (0,06 M Tris HCl [pH 6,8], 5% B-mercaptoethanol, 10% glycerol, 2% SDS, 0,001% Bromophenol blue).

Tahap 3. Analisis fraksi protein dengan SDS-PAGE

Endapan bakteri hasil sentrifugasi dibuat suspensi dengan menambahkan larutan PBS dan dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama dilakukan proses sonikasi selama 9 menit dan kelompok kedua dibiarkan tanpa proses sonikasi. Kedua kelompok suspensi bakteri diambil 100 ul dan ditambah 100 ul sampel buffer (0,06 M Tris HCl [pH 6,8], 5% B-mercaptoethanol, 10% glycerol,

2% SDS, 0,001% Bromophenol blue). Suspensi bakteri kemudian direbus selama 5 menit untuk merusak enzim protease.

Analisis fraksi protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Kadar gel acrylamide yang digunakan adalah 5% untuk *stacking gel* dan 7,5 % untuk *separating gel*. Agar didapat band protein yang cukup jelas, sekurang-kurangnya diperlukan sebanyak 100 ug protein sampel untuk di loading pada masing-masing *well*. *Running* dilakukan pada 20 mA saat sampel di *stacking gel* dan ditingkatkan menjadi 30 mA saat sampel pada *runing gel*. Untuk melihat pita-pita protein, maka gel diwarnai dengan 0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250. Gel yang telah terwarnai dilakukan dokumentasi (Hudson, 1991).

Tahap 4. Uji Resistensi *S. typhimurium*.

Isolat *S. typhimurium* dibiakkan pada tryptic soy broth sampai kekeruhannya setara dengan 0,5 Mc farland. Suspensi bakteri diulaskan secara merata dengan lidi kapas pada permukaan Muller Hinton Agar dan cakram antibiotik ditempelkan di atasnya. Agar diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembacaan dilakukan dengan mengukur daerah yang jernih. Besarnya daerah yang jernih diukur dengan jangka sorong dan dibandingkan dengan standar untuk menentukan resistensinya.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Identifikasi *Salmonella typhimurium*.

a. Identifikasi dengan uji biokimiawi.

Lima isolat *Salmonella* spp. yang berasal dari daging ayam serta dikumpulkan dalam kultur penyimpanan dilakukan pemurnian kembali pada SS agar (Oxoid). Koloni yang terpisah dan diduga bakteri *Salmonella* spp. (diameter koloni adalah kecil dan jernih) diambil untuk dilakukan identifikasi secara biokimiawi (KIA, SIM, LIM, VP dan Citrat).

Hasil identifikasi secara biokimiawi menunjukkan hasil :

KIA : Alkali / asam dan terdapat gas H₂S.

SIM : Indol - (negatif), motylity + (positif).

LIM : Lysine + (positif)

VP : - (negatif)

Citrat : + (positif).

Hasil uji biokimiawi dari bakteri yang menunjukkan sifat-sifat sesuai dengan uji biokimiawi diatas dapat dinyatakan sebagai bakteri *Salmonella* spp.

b. Penentuan serogroup isolat *Salmonella* spp.

Penentuan serogroup *Salmonella* spp dilakukan dengan uji serotyping dari isolat *Salmonella* spp. dengan antisera O (Bio Farma).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ada dua isolat bereaksi positif dengan antisera O sehingga dapat dinyatakan sebagai *Salmonella* sub group B (*S. typhimurium* dan *S. paratyphi B*)

Menggunakan metode yang sama, ditemukan dua isolat *Salmonella* spp. dari penderita diare bereaksi positif dengan antisera O, sehingga ada dua isolat dari tinja penderita diare yang secara biokimiawi dan serotyping identik dengan isolat dari daging ayam.

5.2. Pemeriksaan komponen protein bakteri *Salmonella typhimurium*.

- a. Empat isolat yang telah diuji secara serologis dan dapat dinyatakan sebagai *S. typhimurium* dilakukan perbanyakan pada TSB (trytic soy broth), diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Hasil perbanyakan bakteri ditandai dengan kekeruhan larutan TSB, menandakan adanya pertumbuhan bakteri *S. typhimurium*
- b. Dilakukan sentrifugasi pada suspensi bakteri dengan kecepatan 15.000 rpm dengan suhu 4°C. Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang murni, dilakukan pencucian dengan normal saline steril sebanyak tiga kali. Hasil sentrifugasi berupa endapan dan merupakan sel bakteri yang murni.
- c. Endapan sel bakteri yang murni dibuat suspensi dengan menambahkan PBS dan dibagi menjadi dua bagian. Satu bagian dilakukan pemecahan sel dengan cara sonikasi dan satu bagian lainnya dibiarkan sebagai sel bakteri utuh. Hasil pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa tidak didapatkan sel bakteri utuh lagi setelah dilakukan pemecahan dengan sonikasi.

- d. Kedua kelompok suspensi bakteri (dengan sonikasi dan tanpa sonikasi) dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit.
- e. Dilakukan pemeriksaan komponen protein secara keseluruhan dari bakteri *S. typhimurium* yang masih berupa sel utuh maupun yang telah dilakukan pemecahan sel dengan sonikasi dengan cara SDS-PAGE. Gel yang digunakan untuk stacking gel berkonsentrasi 5% dan running gel 7,5%. Hasil pemeriksaan dengan SDS-Page dilakukan dokumentasi dengan fotografi.

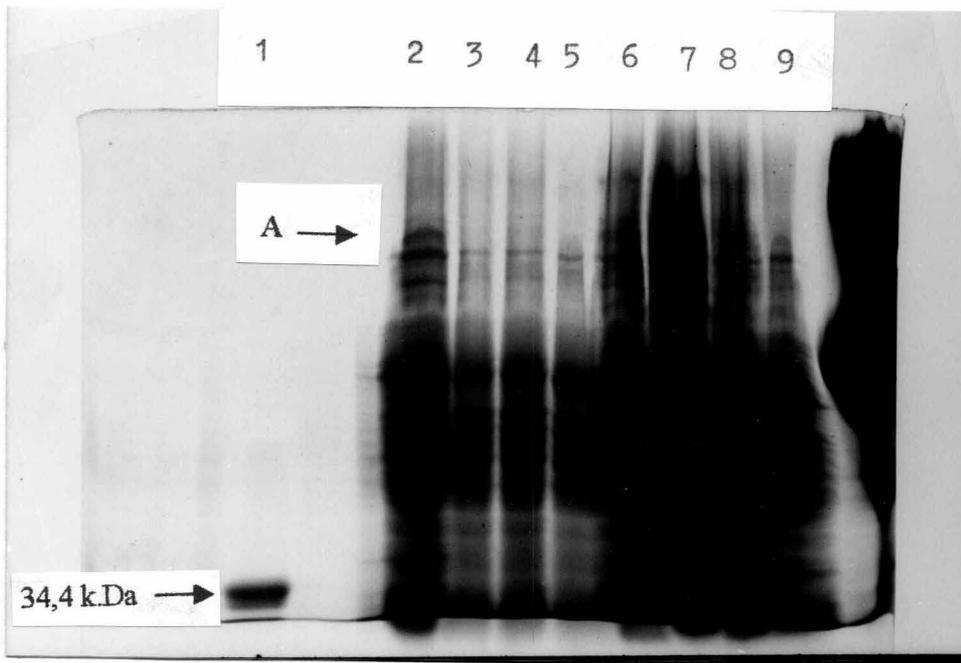


Foto 5.1. Hasil pemeriksaan komponen protein sel utuh *S. Typhimurium* dengan SDS-PAGE.

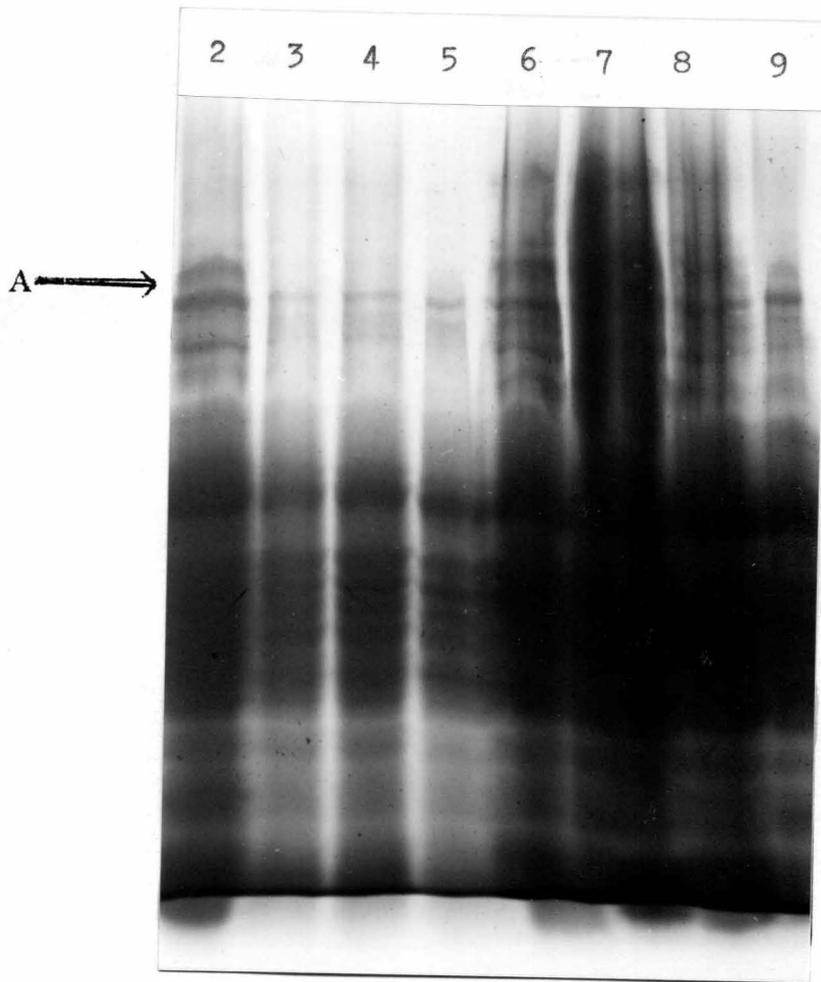


Foto 5.2. Hasil pemeriksaan komponen sel utuh *S. typhimurium* dengan SDS-PAGE dibesarkan pada tempat komponen protein yang berbeda.

Keterangan :

- A, Komponen protein sel bakteri yang berbeda
- Baris No. 1 adalah marker, dengan berat molekul 34,4 kDa.
- Baris No. 2 (H 1), adalah isolat dari manusia.
- Baris No. 3 (H 2), adalah isolat dari manusia
- Baris No. 4 (M 1), adalah isolat dari daging ayam ras
- Baris No. 5 (DS 9), adalah isolat dari daging ayam ras
- Baris No. 2 - 5 telah dilakukan pemecahan bakteri dengan sonikasi selama 9 menit.
- Baris No. 6, (H 1), Isolat dari manusia
- Baris No. 7, (H 2), Isolat dari manusia
- Baris No. 8, (M 1), Isolat dari daging ayam ras
- Baris No. 9, (DS 9), Isolat dari daging ayam ras
- Baris No. 6 - 9, Bakteri tidak dilakukan pemecahan.

Baris ke 2, 3, 4 dan 5 yang berasal dari sampel yang telah dilakukan proses sonifikasi dengan SDS – PAGE memberikan hasil pemeriksaan yang lebih baik dibanding hasil pemeriksaan dari sampel yang belum dilakukan sonifikasi (baris ke 6, 7, 8 dan 9).

Marker protein terdapat pada baris ke 1 dan baris ke 10, marker baris pertama mempunyai berat molekul 34,4 k Da sedangkan marker lainnya merupakan bovine serum albumin dengan berat molekul 66 k Da. Marker yang berasal dari bovine serum albumin tidak menghasilkan pita protein yang dapat dilihat dengan jelas.

5.3. Pemeriksaan resistensi isolat *S. Typhimurium* terhadap beberapa antimikroba.

Isolat bakteri diinokulasikan pada TSB, kemudian diinkubasikan sampai kekeruhan dari media sesuai dengan kekeruhan 0,5 standart Mc. Farland. Menggunakan lidi kapas steril, suspensi bakteri diulaskan secara merata pada permukaan Muller Hinton agar dan kemudian ditempelkan cakram yang telah berisi antimikroba.

Hasil pemeriksaan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik dapat diketahui bahwa isolat H-1 yang berasal dari tinja anak penderita diare adalah peka terhadap semua antibiotik yang diberikan, sedangkan isolat H-2 yang berasal dari tinja anak penderita diare mempunyai kepekaan yang sama dengan isolat M-1 yang berasal dari daging ayam ras. Isolat DS-9 yang berasal dari daging ayam ras resisten terhadap dua antibiotik, tetapi polanya tidak sama dengan isolat H-2 dan M-1.

Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Kepekaan Bakteri terhadap beberapa antimikroba :

Antimikroba Sampel	C 30	CFP 75	SXT 25	CIP 5	NA 30	Amp 10
H 1	20,39 S	21,12 S	24,05 S	22,5 S	20,7 S	17,54 S
H 2	20,72 S	17,78 MS	0 R	24,14 S	20,69 S	0 R
M 1	23,75 S	9,80 R	0 R	30,73 S	22,35 S	0 R
DS 9	27,66 S	26,45 S	0 R	18,71 S	0 R	22,06 S

Keterangan :

- C 30 : Chloramphenicol
 CFP 75 : Cefoperazone
 SXT 25 : Sulfamethoxazole / Trimethoprim
 CIP : Ciproxin / Ciprofloxacine
 NA 30 : Nalidixic Acid
 Amp 10 : Ampicillin
 S : Sensitif.
 MS : Sensitif sedang
 R : Resisten

- H-1 : Isolat dari tinja anak penderita diare
 H-2 : Isolat dari tinja anak penderita diare
 M-1 : Isolat dari daging ayam ras
 DS-9 : Isolat dari daging ayam ras

BAB VI

PEMBAHASAN

Salmonellosis pada manusia dapat menghasilkan gejala klinis dari gangguan saluran cerna sampai kematian. Sumber penularan penyakit salmonellosis akibat *S. Typhimurium* terutama berasal dari hewan ternak, produk makanan asal ternak, hewan-hewan kesayangan (anjing dan kucing). Manusia yang menderita gastroenteritis dapat menularkan secara langsung ataupun tidak langsung dengan cara menkontaminasi makanan (Joklik *et al.*, 1992., Woodward *et al.*, 1997).

Penanganan, pencegahan dan pemberantasan penyakit salmonellosis ini sangat tergantung pada berbagai macam persoalan antara lain, ketepatan penentuan penyakit secara klinik dan laboratorik sehingga dapat diberikan pengobatan yang tepat. Pemberian antibiotik pada gastroenteritis akibat *Salmonella* spp. harus hati-hati, sebab dapat memperpanjang kondisi karier dari pasien (Joklik *et al.*, 1992).

Daging ayam merupakan bahan makanan yang dilaporkan paling sering bertindak sebagai sumber untuk terjadinya penyakit salmonellosis (Doyle and Cliver, 1990). Kontaminasi *Salmonella* spp pada daging ayam yang tinggi ini disebabkan penularan melalui makanan ayam (berprotein tinggi dan sering bertindak sebagai sumber penular pada ayam), litter yang telah terkontaminasi dan dimakan oleh anak ayam, kandang pembawa ayam ketempat pemotongan, breeder yang karier *Salmonella* spp. sehingga anak ayam telah terkena secara vertikal dan paling sering terjadi selama proses pemotongan ayam.

Deteksi bakteri *Salmonella* spp. pada bahan makanan mempunyai kendala yang cukup besar, misalnya jumlah bahan makanan yang sangat besar sehingga sangat mungkin terjadi kesalahan pengambilan sampel, kemampuan perkembangan bakteri pada bahan makanan sehingga mudah terjadi bias (tidak diketemukan pada waktu sampling tetapi karena perkembangbiakan bakteri, jumlahnya menjadi sangat banyak waktu bahan makanan siap dikonsumsi) dan pemeriksaan bakteri yang memerlukan waktu yang lama sehingga bahan makanan menjadi rusak atau perlu tambahan biaya untuk fasilitas penyimpanan.

Ng *et al.* (1996), mengembangkan suatu metode pemeriksaan bakteri *Salmonella* pada bahan makanan dengan cara cepat dan akurat menggunakan ELISA dengan antibodi monoklonal, dengan metode ini bakteri *Salmonella* dapat dideteksi dan ditentukan serogroupnya dalam waktu 30 jam tetapi metode ini memerlukan sarana dan prasarana yang canggih dan reagen yang mahal sehingga sulit untuk diterapkan secara luas pada produk makanan disini.

Pemeriksaan sumber infeksi salmonellosis penting untuk dilakukan agar dapat dilakukan tindakan pencegahan dan pemberantasan dari penyakit sehingga dapat memutus rantai penyebaran penyakit dan tidak menyebar ke masyarakat luas. Penentuan sumber infeksi erat kaitannya dengan prioritas penanganan lingkungan karena pada umumnya pembenahan lingkungan memerlukan sumber dana yang sangat besar. Terdapatnya bakteri *Salmonella* spp. pada lingkungan sekitar penderita ataupun terdapatnya bakteri pada bahan makanan yang dikonsumsi oleh penderita

gastroenteritis belum mencerminkan bahwa lingkungan atau bahan makanan tersebut merupakan sumber infeksi.

Sumber infeksi dapat ditentukan jika bakteri pada penderita mempunyai kesamaan pada tingkat tertentu dengan bakteri yang berasal dari luar penderita. Penentuan tingkat kesamaan dari isolat yang sumbernya berbeda ini dapat dilakukan dengan metode yang sederhana dengan tingkat ketelitiannya rendah sampai tingkatan biologi molekular yang tingkat ketelitiannya sangat tinggi (Baron *et al.*, 1994).

Pemilihan teknik pemeriksaan untuk melihat kesamaan dari isolat yang berbeda ini terutama didasarkan atas standarisasi dari sistim yang dipilih, dapat diulang, sensitif, stabil, bahan-bahannya mudah didapat, murah dan telah teruji kemampuannya dalam penelitian epidemiologi (Baron *et al.*, 1994). Pemilihan teknik untuk survey epidemiologi lebih sering dilakukan berdasarkan pertimbangan biaya dan kemampuan sarana prasarana yang dimiliki, karena pekerjaan survey epidemiologi umumnya dikerjakan untuk sampel dalam jumlah yang besar dan jangka waktu yang lama.

Boyer (1993), menyatakan bahwa teknik SDS-PAGE merupakan teknik pemeriksaan protein yang murah, mudah dan telah digunakan sejak lama. Teknik SDS-PAGE mempunyai beberapa keunggulan, antara lain : peralatan yang dibutuhkan relatif sederhana (beberapa peneliti di Indonesia telah mampu membuat sendiri peralatannya), reagen tidak mahal dan mudah untuk didapatkan, penyimpanan reagen dapat dilakukan pada suhu kamar dan masa pakai reagen cukup lama.

Teknik SDS-PAGE dapat mendeteksi protein dari 1 kDa sampai 1.000 kDa sehingga hampir seluruh komponen protein bakteri dapat dideteksi dengan metode ini. Ketajaman hasil pemisahan komponen protein bakteri dapat ditingkatkan dengan cara mengatur kekentalan gel polyacrylamid untuk komponen protein dengan berat molekul tertentu.

Hasil pemeriksaan komponen protein *S. typhimurium* dengan menggunakan running gel 7,5%, terlihat bahwa marker protein dengan berat molekul 34,4 kDa menghasilkan pita yang terbentuk sangat tajam dan terletak hampir diujung dari gel. Hasil ini sesuai dengan standar penggunaan kekentalan dari gel polyacrylamid, bahwa komponen protein dengan berat molekul 30 kDa sampai 300 kDa sangat baik ketajamannya jika digunakan gel dengan kekentalan 7,5% (Boyer, 1993).

Ausubel *et al.* (1995), menyatakan bahwa komponen protein dalam pemeriksaan dengan SDS-PAGE bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (dari atas ke bagian bawah pada sistem tegak). Kecepatan pergerakan komponen protein sangat dipengaruhi oleh medan elektrik yang digunakan, ukuran komponen protein, muatan komponen protein dan kekentalan dari gel. Komponen protein dengan berat molekul kecil akan bergerak lebih cepat sehingga pita yang terbentuk terdapat di bagian bawah dari gel sedangkan pita di sebelah atas merupakan komponen protein dengan berat molekul yang besar.

Pemeriksaan protein yang bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein perlu dilakukan keseragaman muatan molekul, sehingga kecepatan gerak hanya dipengaruhi oleh berat molekul protein saja. Sodium Dodecyl Sulphat (SDS) adalah

suatu deterjen yang mampu merusak struktur protein sekunder, tersier dan kuaterner untuk membentuk rantai polipeptida yang linear dan dilapisi dengan muatan negatif molekul SDS sehingga muatan molekul protein menjadi seragam.

Perebusan sampel selama 5 menit dalam teknik SDS-PAGE dimaksudkan untuk merusak enzim protease dan membantu pemecahan protein menjadi beberapa komponen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang telah dilakukan pemecahan bakteri dengan sonikasi dan dilakukan pemeriksaan secara SDS – PAGE dengan konsentrasi protein yang diencerkan (baris 2, 3, 4 dan 5), memberikan ketajaman pemisahan antara satu pita dengan pita lainnya yang lebih baik, hal ini disebabkan protein telah terpecah menjadi beberapa komponen dengan proses sonikasi sehingga setelah dilakukan pemisahan komponen dengan SDS-PAGE perbedaan komponen protein satu dengan lainnya dapat terlihat secara jelas sebaliknya pada baris ke 6, 7, 8 dan 9, sampel tidak dilakukan sonikasi terlebih dahulu dan protein tidak diencerkan sehingga hasil pemeriksaan menunjukkan pemisahan yang tidak dapat diamati dengan jelas.

Agar protein dapat terpecah menjadi komponen-komponen protein yang terpisah, perlu ditambahkan mercaptoethanol. Bahan ini berperan dalam denaturasi protein dengan cara merusak jembatan disulfida dari protein.

Pengecatan protein dapat dilakukan dengan beberapa macam cara, yaitu pengecatan coomasie blue dan pengecatan perak. Pengecatan perak mempunyai sensitifitas yang sangat tinggi, mampu mendeteksi 2 – 5 ng/ pita protein sedangkan pengecatan dengan coomasie blue memerlukan konsentrasi protein yang lebih tinggi

(0,3 – 1 ug / pita protein) tetapi pengecatan coomasie blue lebih ekonomis dibanding pengecatan perak.

Hasil pemeriksaan komponen protein sel utuh dari bakteri *Salmonella typhimurium* menunjukkan adanya perbedaan komponen protein dari sampel H-1 (isolat *S. typhimurium* dari tinja anak penderita diare) terhadap ketiga isolat lainnya, baik yang berasal dari isolat tinja anak penderita diare maupun isolat yang berasal dari daging ayam ras.

Perbedaan komponen protein ini terletak pada pita disebelah atas dari gel sehingga dapat dikatakan merupakan protein dengan berat molekul yang cukup besar. Protein dengan berat molekul besar ini secara umum mempunyai kemampuan immunogenik yang lebih baik dibandingkan dengan protein dengan berat molekul ringan (Soebowo, 1993).

Komponen protein pada isolat H-1 yang berasal dari tinja anak penderita diare ternyata berbeda dengan komponen protein isolat H-2 yang berasal dari penderita diare. Lingkungan asal dari kedua isolat ini adalah serupa yaitu saluran pencernaan dari anak, tetapi tidak sama persis sehingga perbedaan komponen protein yang terjadi disebabkan karena perbedaan faktor genetik dari masing-masing isolat dan perbedaan yang terjadi pada saluran cerna masing-masing individu.

Faktor genetik yang berbeda antara satu bakteri dengan bakteri lainnya itu antara lain adalah terdapatnya lokus lokus *Inv* pada *S. typhimurium* yang merupakan kelompok gen yang berfungsi untuk mengatur sekresi protein independen. Lokus *Inv* yang telah dapat diidentifikasi diantaranya *Inv A*, *Inv B*, *Inv C*, *Inv E*, *Inv F*, *Inv G*,

Inv K, Inv L, Inv M, Inv N dan Inv O. Lokus *Inv* ini berperan untuk masuknya *S. typhimurium* kedalam kultur sel (Zierler and Galan, 1995 dalam Roth *et al.*, 1995).

Penelitian secara invitro dalam kultur sel epitel diketahui bahwa lokus *Inv B* dan *Inv C* dengan dibantu promotor T 7 dapat menghasilkan komponen protein dengan berat molekul 15 dan 47 kDa (Eichelberg *et al.*, 1994).

Pathogenicity islands, merupakan faktor genetik lain yang berperan dalam kemampuan virulensi dari bakteri. *Pathogenicity islands* merupakan segmen besar dan tidak stabil dari kromosom dan hanya terdapat pada bakteri yang patogen, sedangkan strain yang non patogen tidak mempunyai *Pathogenicity islands*.

S. typhimurium diketahui mempunyai dua macam *Pathogenicity islands* yang disebut SP-1 dan SP-2. *Pathogenicity islands* dapat ada atau menghilang dari kromosom bakteri sehingga patogenitas bakteri *S. typhimurium* bisa muncul atau menghilang (Ochman and Groisman, 1996).

Lokus *inv* dan *Pathogenicity islands* dari bakteri *S. typhimurium* ini berperan dalam proses kolonisasi di mukosa, penetrasi pada sel non phagosit dan kemampuan untuk memperbanyak diri secara intrasel. Lingkungan intrasel memberikan perlindungan bakteri dari mekanisme pertahanan imunologi yang dipunyai oleh sel host dan menyediakan makanan yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri.

Perlekatan *Salmonella* spp. pada permukaan mukosa akan mengaktivasi epidermal growth faktor (EGF), aktivasi EGF merangsang mitogen activated protein (MAP) kinase, mengaktifkan phospholipase A₂ (PLA₂) dan menghasilkan

arachidonic acid dari membran phospholipid. Arachidonic acid dimetabolisme melalui jalur lipoxigenase dan hasil akhirnya adalah leukotriene D₄ (LTD₄). Leukotriene D₄ secara langsung atau tidak langsung akan membuka saluran Ca²⁺ pada membran plasma sehingga menyebabkan aliran Ca²⁺ kedalam sel. Peningkatan dalam sel diperlukan untuk masuknya bakteri *Salmonella* spp kedalam sel.

Proses perlekatan bakteri pada sel host juga menyebabkan peningkatan yang besar dari protein cytoskeleton (actin, α actinin, ezrin, talin, tubulin dan tropomyosin) dan terjadi akumulasi dibawah membran pada titik kontak antara bakteri dan sel (Zierler and Galan, dalam Roth *et al.*, 1995).

Cirillo *et al.*(1996) melaporkan adanya plasmid virulensi yang diberi kode *rck* pada *S. typhimurium*. Plasmid ini berpengaruh pada *outer membrane protein* (OMP) dengan berat molekul 17-19 kDa. OMP ini berperanan dalam daya tahan yang tinggi terhadap aktivitas bakterisidal dari komplemen dan berperan dalam penempelan serta invasi pada kultur sel mammalia. Plasmid adalah komponen genetik diluar kromosom yang dapat dipindahkan dari satu bakteri ke bakteri lainnya dalam lingkungan yang sama (Joklik *et al.*, 1992).

Isolat H-1 yang berasal dari tinja anak penderita diare, mempunyai komponen protein yang berbeda dengan isolat H-2, hal ini karena adanya perbedaan faktor genetik dan juga disebabkan faktor lingkungan. Flora normal dalam saluran pencernaan, jenis dan jumlah antimikroba yang telah dikonsumsi serta tingkat immunitas dari satu penderita sangat berbeda dengan penderita lainnya.

Joklik *et al.* (1992), menyatakan bahwa faktor virulensi dari *Salmonella* spp. hanya terdapat pada keadaan dan host tertentu saja.

Komponen protein sel utuh isolat H-1 berbeda dengan komponen protein sel utuh isolat M-1 dan DS-9, hal ini disebabkan isolat ini berasal dari lingkungan yang sangat berbeda. Isolat H-1 berasal dari saluran cerna anak yang mempunyai pH sangat asam sampai basa, beberapa enzim diantaranya enzim pankreas yang berperan sebagai proteolisis antigen, tekanan osmose hipertonis, gerakan peristalsis usus adanya sistem imunologik yang melapisi mukosa usus (Soeparto, 1997). Isolat M-1 dan DS-9 berasal dari daging ayam ras yang merupakan tempat pertumbuhan bakteri yang sangat baik karena tersedianya bahan makanan yang diperlukan bakteri, lingkungan yang menguntungkan bakteri dan secara alamiah tidak mempunyai substansi penghalang atau penghambat pertumbuhan (Soeparno, 1992). Kondisi daging ayam ras ini memungkinkan bakteri *Salmonella* spp. dapat tumbuh tanpa hambatan sama sekali.

Pengaruh lingkungan ini sangat besar peranannya dalam pembentukan komponen protein tertentu dalam bakteri *Salmonella* spp. Laporan Botsford *et al.* (1994), menyatakan adanya akumulasi glutamat sebanyak 290 sampai 430 n mol /mg protein jika bakteri dibiakkan pada medium minimal dengan 500 mM Na Cl, K Cl atau sukrosa. *Salmonella* spp pada pertumbuhan normal dalam suasana aerob mempunyai kandungan glutamat hanya sebesar 125 n mol/mg protein.

Rangsangan asam lemah terhadap *Salmonella* spp. akan mengakibatkan terbentuknya protein membran luar spesifik, sehingga bakteri mempunyai ketahanan

yang lebih baik terhadap stress, termasuk stres panas, garam, sistem peroksidase yang aktif, crystal violet dan polymixin B (Leyer and Johnson, 1993).

Pengaruh lingkungan tidak berperan dalam perbedaan komponen protein dari satu isolat dengan isolat lainnya, sebab dalam penelitian ini semua isolat dilakukan perbanyakan pada media, temperatur, tekanan oksigen dan faktor lainnya yang dibuat seragam sehingga adanya perbedaan komponen protein antara isolat satu dengan isolat lainnya murni mencerminkan perbedaan genetik dari masing-masing isolat.

Gen yang diketahui mengkode sekresi protein dari salmonella, diantaranya : Inv. H mengkode sekresi protein dengan berat molekul 16,5 k Da., Inv. A, 71 k Da., Inv. E, 43 k Da., Inv. B, 15 k Da., Inv. C, 47 k Da., Inv. J, 36 k Da., Spa Q, 9 k Da., Prg. I, 8,8 k Da., Prg J, 10,9 k Da., Prg K, 28 k Da., Org A, 48 k Da., Sip B, 63 k Da. (Darwin and Miller, 1999).

Komponen protein sel utuh bakteri *Salmonella* yang diperiksa adalah komponen protein yang terdapat di sel bakteri, sedangkan protein hasil metabolisme yang terdapat pada kultur sel dan permukaan bakteri sudah hilang sewaktu dilakukan pencucian sebanyak tiga kali.

Baron *et al.* (1994), menyatakan bahwa pemeriksaan bakteri secara biokimiawi, pola sensitivitas terhadap antimikroba dan pemeriksaan serologi dapat digunakan sebagai metode typing sederhana dan mudah dalam pelaksanaannya, tetapi cara ini ketelitiannya kurang baik. Dalam penelitian ini telah dilakukan pemeriksaan secara biokimiawi dan didapatkan hasil bahwa ke empat isolat adalah bakteri *Salmonella* spp. sehingga pemeriksaan secara biokimiawi tidak bisa membedakan

bakteri *Salmonella* spp. satu dengan lainnya. Pemeriksaan secara serologi terbatas sampai penggunaan antisera O, sehingga hanya bisa menentukan sampai subgroup dari *Salmonella* spp. mengingat mahalnya antisera monoklonal yang mampu mendeteksi sampai ke tingkat spesies.

Antisera O terhadap *Salmonella* spp. berikatan secara spesifik terhadap rantai samping dari lipopolisakarida. Keberadaan rantai samping ini sangat dipengaruhi oleh lipopolisakarida inti sehingga bila ada perubahan pada lipopolisakarida inti juga akan berpengaruh terhadap keberadaan rantai samping lipopolisakarida (antigen O) yang mampu berikatan spesifik dengan antisera O. Perubahan lipopolisakarida inti ini mulai dari kegagalan pembentukan rantai samping lipopolisakarida yang ditandai dengan terbentuknya koloni yang kasar pada agar pertumbuhan sampai kegagalan pembentukan glycolipid sehingga bakteri tidak mampu tumbuh sehingga tidak bisa diperiksa lebih lanjut (Joklik *et al.*, 1992).

Beberapa kasus di laboratorium menunjukkan keberadaan *Salmonella* spp. yang positif dengan pemeriksaan secara biokimiawi tetapi setelah diperiksa secara serologi menunjukkan hasil yang negatif, *Salmonella* spp ini adalah bakteri yang telah mengalami mutasi sehingga sifat antigeniknya telah berubah.

Hasil pemeriksaan resistensi bakteri terhadap antibiotik menghasilkan suatu pola resistensi yang berbeda satu dengan lainnya (isolat H-1 berbeda dengan isolat H-2 yang keduanya berasal dari tinja anak penderita diare, dan isolat M-1 berbeda dengan isolat DS-9 yang keduanya berasal dari daging ayam ras). Perbedaan resistensi bakteri terhadap antibiotik ini diakibatkan oleh mutasi, perubahan genetik

dan adanya plasmid dari masing-masing bakteri yang berbeda. Resistensi yang terjadi akibat adanya plasmid R dari bakteri ini sangat sulit jika digunakan untuk typing karena plasmid ini dapat dipindahkan pada bakteri lain dengan strain yang sama atau yang berbeda sehingga dapat dimungkinkan seluruh bakteri dalam lingkungan yang sama akan mempunyai pola resistensi yang sama akibat menerima plasmid dari bakteri yang telah resisten (Joklik *et al.*, 1992).

Penggunaan antibiogram terhadap isolat bakteri dapat berperan sebagai salah satu teknik dalam penentuan persamaan dan perbedaan dari isolat bakteri yang berbeda. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa isolat H-1 ternyata peka terhadap semua antibiotik yang digunakan dan isolat lainnya ternyata menunjukkan resistensi terhadap dua macam antibiotik yang digunakan, sehingga hasil uji sensitivitas ini tidak dapat digunakan untuk menunjukkan perbedaan dari isolat yang berbeda.

Pemilihan metode yang digunakan untuk penyimpanan harus memperhatikan beberapa hal, diantaranya : daya hidup dari bakteri, perubahan populasi akibat pengambilan koloni, perubahan genetik selama penyimpanan, kemurnian dari kultur, jumlah kultur yang harus disimpan, biaya penyimpanan, nilai dari kultur dan frekuensi penggunaan kultur (Kirsop and Snell, 1984).

Penyimpanan kultur bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari metode penyimpanan dengan sub kultur, metode ini dipilih karena peralatan sederhana dan biaya yang murah. Masalah yang dihadapi dengan menggunakan metode penyimpanan ini adalah terjadinya kontaminasi, dengan melakukan pemeriksaan ulang terhadap kultur yang akan disimpan kembali maka resiko

kontaminasi dapat diminimalkan. Sifat-sifat bakteri mungkin dapat berubah jika sering dilakukan penanaman kembali, hal ini dapat dikurangi dengan menanam dalam jumlah yang banyak sehingga sifat aslinya **masih dapat dipertahankan**. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini hanya diambil dari stok penyimpanan yang belum pernah dilakukan sub kultur sehingga belum terjadi perubahan sifat bakteri.

Hasil penelitian penggunaan teknik pemeriksaan komponen protein sel utuh bakteri *Salmonella* spp. untuk membedakan isolat satu dengan isolat lainnya dalam aplikasi klinik memerlukan penelitian lebih luas untuk melengkapi data yang telah ada. Penelitian lanjutan yang diperlukan diantaranya : menguji kesamaan komponen protein sel utuh dari dua bakteri yang berasal dari isolat yang sama (di isolasi dari **tinja** anak penderita diare dan sebagian ditumbuhkan pada hewan coba kemudian dipanen kembali), menguji sensitifitas dan spesifisitasnya terhadap pemeriksaan tingkat molekuler.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan.

- a. Pada gambaran komponen protein sel utuh bakteri *S. typhimurium* yang diisolasi dari tinja anak penderita diare dan daging ayam ras terdapat perbedaan komponen protein dari isolat H-1 terhadap ketiga isolat lainnya (H-2, M-1 dan DS-9).
- b. Penggunaan teknik SDS-PAGE untuk analisis komponen protein sel utuh dari *S. typhimurium* dari isolat tinja anak penderita diare dan isolat dari daging ayam ras, ternyata mampu mendeteksi perbedaan komponen protein dari masing-masing isolat.

7.2. Saran

- a. Perlu dilakukan perbandingan pemeriksaan dengan pemeriksaan secara molekular yang lebih teliti agar dapat diukur sensitifitas dan spesifisitasnya.
- b. Perlu dilakukan pengukuran dengan gel doc agar data yang didapat lebih obyektif dan teliti. Pemeriksaan secara langsung hanya dapat mengetahui pita yang berbeda secara mencolok saja, sedangkan pita yang terlihat sama tetapi kadarnya berbeda tidak dapat ditentukan secara pasti.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, 1995. Biochemical organic Compounds for Research and Diagnostic Reagen. Sigma Chemical Company. USA. p. 1913-1920.
- Ausubel F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, 1995. Shor Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. p. 10.2.2 – 10.2.10
- Barnes G.L., E. Uren, K.B. Stevens, R.F. Bishop, 1998. Etiology of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children in Melbourne , Australia, From April 1980 to March 1993. J. Clin. Microbiol. Jan; 36(1) : p. 133-8.
- Baron E.J., L.R. Peterson and S.M. Finegold., 1994. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th. Mosby. Baltimore. p. 362 – 384.
- Baumler A.J., T.L. Norris., T. Lasco., W. Voigt., R. Reissbrodt., W. Rabsch and F. Heffron. 1998. Iron, a Novel Outer Membrane Siderophore Receptor. J. of Clinical Microbiology. p. 762 – 765.
- Botsford J.L., M. Alvarez., R. Hernandez and R. Nichols. 1994. Accumulation of Glutamate by *Salmonella typhimurium* in Response to Osmotic Stress. Appl. Environ. Microbiol. Vol .60, No. 7. p. 2568 – 2574.
- Boyer R.F. 1993. Modern Experimental Biochemistry. 2ndEd. The Benyamin/Cumming Publishing Company, Inc. Tokyo. p. 115 – 143.
- Bridson E.Y. 1990. The Oxoid Manual. 6th Ed. Alphaprint. Hampshire. p. 2.196 – 2.199.
- Cirillo D.M., E.J. Heffernan., L. Wu., J. Harwood., J. Fierer and D.G. Guiney. 1996. Identification of a Domain in Rck, a Product of the *Salmonella typhimurium* Virulence Plasmid, Required for Both Serum Resistance and Cell Invasion. Infect. Immun. Vol. 64, No. 6. p. 2019 – 2023.
- Corre C.H.L., P.Y. Donnio., M. Perrin., M.F. Travert and J.L. Avril., 1996. Increasing Incidence and Comparison of Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Serotype *Typhimurium* Isolates from Humans and Animals. J. of Clinical Microbiology. Vol, 37, No. 1. p. 266-269.

- Darwin K.H. and V.L. Miller., 1999. Molecular Basis of The Interaction of *Salmonella* With the Intestinal Mucosa. *Clinical Mic. Reviews*. Vol. 12, No. 3, p. 405 - 428.
- Doyle M.P. and D.O. Cliver. 1990. *Salmonella*. Dalam D.O Cliver (eds) : Food Borne Diseases. Academic Press, Inc. California. p. 186 – 203.
- Eichelberg K., C.C. Ginocchio and J.E. Galan. 1994. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella typhimurium* Invasion Genes *inv B* and *inv C* : Homology of *inv C* to the F0F1 ATPase Family of Protein. *J. Bacteriol*. Vol. 176, No. 15, p. 4501 – 4510.
- Engraber M and M. Loos. 1992. A 66-kilodalton Heat Shock Protein of *Salmonella typhimurium* is Responsible for Binding of the Bacterium to Intestinal Mucus. *Infect. Immun.*, Vol. 60. No. 8. p. 3072 – 3078.
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley and S.T. Williams. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. William & Wilkins. Baltimore. p. 427 – 457.
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th. William & Wilkins. Baltimore. p. 186 – 187.
- Hudson L and F.C. Hay. 1991. *Practical Immunologi*. 3RD. Ed. Blackwell Scientific Publication. London. p. 65 – 69.
- Humphrey T.J., N.P. Richardson., K.M. Statton and R.J. Rowbury. 1993. Effect of Temperature Shift on Acid and Heat Tolerance in *Salmonella enteridis* Phage type 4. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol .59, No. 9. p. 3120-3122.
- Joklik W.K., H.P. Willett., D.B. Amos and C.M. Wilfert. 1992. *Zinsser Microbiology* 20th Ed. Appleton & Lange. California. p. 559 – 563
- Jay J.M. 1986. *Modern Food Microbiology*. 3rd Ed. Van Nostrad Reinhold. New York. p. 489 – 520.
- Kamerbeek J., L. Schouls, M.V. Agterveld, D.V. Soolingen, J.V. Embden. 1995. Spoligo Typing “ a Method to Detect and Type *M. tuberculosis* complex. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven. The Netherland. p. 1 – 5.

- Khan I.A., A. Rattan., T. Fatima., F.G. Khan and A. Kalia. 1996. Application of Whole Cell Protein Analysis by SDS PAGE to Establish the Source of *Salmonella typhimurium*. *J. of Infection*. Vol. 33. p. 169-171.
- Kirby, 1992. DNA Finger Printing. An Introduction. WH Freeman and Company. New York. p. 1 – 33.
- Kirsop B.E. and J.J.S. Snell, 1984. Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press. Inc. London. p.11 – 15.
- Lee L.A., V.L. Threath., N.D. Puhr., P. Levine., K. Ferris., R.V. Tauxe. 1993. Antimicrobial Resistant *Salmonella* spp Isolated From Healthy Broiler Chickens After Slaughter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Mar 1; 202(5). p. 752 - 755.
- Leyer G.J. and E.A. Johnson. 1993. Acid Adaption Induces Cross-Protection Against Environmental Stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol .59, No. 6. p. 1842 – 1847.
- Lindawati A., E.B. Wasito and D.Raharjo, 1997. Isolasi, Identifikasi dan Uji Kepekaan Bakteri Enteropathogen dari Daging. Lembaga Penelitian - Unair, Surabaya.
- Mendis L., G. Kumarasinghe, C. Chow, H.Y. Liew, N.P. Ramachandran, K. Jayawardane, K.T. Thong, J.L. Howe, E.W. Lim, V. Zaman. 1995. Bacteria, Viruses, Yeasts and Protozoans Associated with Diarrheal Disease in Singapore. *Pathology*. Jan; 27 (1): p. 48 – 52.
- Newcomb S., L. Broadhurst and K. Kissane, 1997. *Salmonella* Outbreak in an American Child Development Center in Germany. *Mil – Med.* Dec; 162 (12) : 783 – 7.
- Ng S.P., Co. Tsui ., D. Robert., P.Y. Chau., M.H. Ng., 1996. Detection and Serogroup Differentiation of *Salmonella* spp. In Food Within 30 Hours by Enrichment-Immunoassay With a T6 Monoclonal Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Appl. Environ. Microbio.*, Vol 62, No.7. p.2294-2302.
- Ochman H. and E.A. Groisman. 1996. Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*. Vol. 64, No. 12, p.5410 -5412.
- Petter J.G., B. Laksmi., R. Carlson and K. Ingram. 1995. Characterization of Lipopolysaccharide Heterogeneity in *Salmonella enteridis* by an Improved

- Gel Electrophoresis Method. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 61. No. 8, p. 2845 – 2851.
- Roth J.A., C.A. Bolin., K.A. Brogden., F.C. Minion and M.J. Wannemuehler. 1995. Virulence Mechanisme of Bacterial Pathogen. ASM Press. Washington, D.C. p. 33 – 48.
- Ruzickova V. 1996. The Effect of Acidification on *Salmonella enteridis* in a Defined Medium. Vet-Med-Praha. 41 (1), p. 25-31.
- Saidi S.M., Y. Iijima, W.K. Sang, A.K. Mwangudza, J.O. Oundo, K. Taga, M. Aihara, K. Nagayama, H. Yamamoto, P.G. Waiyaki, T. Honda. 1997. Epidemiological Study on Infectious Diarrheal Disease in Children in a Coastal Rural Area of Kenya. Microbiol Immunol. 41(10): p. 773-8.
- Samonis G., S. Maraki, A. Christidou, A. Georgiladakis, Y. Tselentis. 1997. Bacterial Pathogens Assosiated with Diarrhoea on the Island of Crete. Eur. J. Epidemiol. Oct : 13(7): p. 831-6.
- Smulder EJM. 1987. Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry. Elsevier. Amsterdam. p. 27 – 37.
- Soeparno. 1992. Ilmu dan Teknologi Daging. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. hal. 200 – 206.
- Soeparto P., FM. Judajana., S.T. Putra., S.M. Sudarmo. 1997. Imuologi Mukosal Kedokteran. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran. Fak. Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 49 - 101
- Subowo. 1993. Imunologi. Penerbit Angkasa. Bandung. hal. 33 – 36.
- Tang S.W., S. Abubakar., S. Devi., S. Puthuchearry and T. Pang. 1997. Induction and Characterization of Heat Shock Protein of *Salmonella typhi* and Their Reactivity With Sera from Patients With Typhoid Fever. Infect. Immun. Vol. 65, No. 7, p. 2983 – 2986.
- Threlfall E.J., B. Rowe., L.R. Ward. 1993. A Comparison of Multidrug Resistance in *Salmonellas* from Humans and Food Animal in England and Wales, 1981 and 1990. Epidemiol-Infect. Oct; 111 (2) : p.189 - 197.
- Woodward D.L., R. Khakhria, W.M. Johnson. 1997. Human Salmonellosis Associated With Exotic Pets. J. of Clinical Microbiology. P. 2786 – 2790.

Zierler M.K., J.E. Galan. 1995. *Paradigms In Bacterial Entry Into Host Cells. Dalam* J.E. Roth, C.A. Bolin, K.A. Brogden, F.H. Minion, M.J. Wannemuehler (eds) : *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogen*. 2nd Ed. ASM Press. Washinton DC. p. 21 – 32.