ISOLASI DAN KARAKTERISASI *Salmonella spp.* DI LINGKUNGAN PETERNAKAN AYAM BROILER DI KOTA MALANG

SKRIPSI

Oleh :

ARWENIUMA IKAWIKANTI

0811310008

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ISOLASI DAN KARAKTERISASI *Salmonella spp.* DI LINGKUNGAN PETERNAKAN AYAM BROILER DI KOTA MALANG

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

ARWENIUMA IKAWIKANTI

0811310008

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul:

Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.* di Lingkungan Peternakan Ayam Broiler di Kota Malang

oleh:

Arweniuma Ikawikanti

0811310008

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Februari 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1	Pembimbing 2
drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc	drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech
NIP 19560210 198403 2 001	NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,	Mengetahui,
Ketua Program Kedokteran Hewan	Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Program Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS	Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP 194806151 197702 2 001	NIP. 19600903 198802 2 001

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	: Arweniuma Ikawikanti
NIM	: 0811310008
Program Studi	: Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul	:Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.* di Lingkungan Peternakan Ayam Broiler Di Kota Malang

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Februari 2013

Yang menyatakan,

Arweniuma Ikawikanti

0811310008

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.* di Lingkungan Peternakan Ayam Broiler di Kota Malang

ABSTRAK

Salmonella spp. merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat menyebabkan *foodborne disease* pada produk ayam broiler yang dapat mengkontaminasi sejak dari peternakan. Kurangnya penerapan biosekuriti pada lingkungan peternakan dapat menyebabkan transmisi dan kontaminasi *Salmonella spp*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya cemaran *Salmonella spp.* serta mengetahui karakteristik *Salmonella spp.* di peternakan ayam Mertojoyo dan Sawojajar. Sampel yang digunakan adalah feses, pakan dan air minum yang berasal dari peternakan ayam di Mertojoyo dan Sawojajar, Malang. Penelitian ini dilakukan melalui tahapan metode mikrobiologi standar, uji biokimia, uji serologis dan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk mengetahui profil pita protein *Salmonella spp.* dari sampel peternakan ayam broiler. Hasil karakterisasi bakteri berdasarkan uji mikrobiologi, uji biokimia, uji serologi dan profil pita protein dianalisa secara deskriptif. Hasil isolasi bakteri dari feses di Mertojoyo ditemukan kisaran jumlah bakteri dengan rerata $4{,}9 \times 10^8$ ±11,34 cfu/ml dan Sawojajar $3{,}2 \times 10^8$ ±1,70 cfu/ml, sedangkan isolasi bakteri dari air minum dengan kisaran jumlah rerata, Mertojoyo $5{,}8 \times 10^8$±16,36 cfu/ml dan Sawojajar $3{,}8 \times 10^8$ ±4,82 cfu/ml. Dari 5 isolat hasil karakterisasi fenotipe berhasil dilakukan pendugaan isolat mendekati genus *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella sub genus* I (*S. kauffmannii; S. enterica; S. enteritidis*), *Salmonella sub genus* II (*S.salamae; S.dar-es-salaam*), *Salmonella sub genus* IV (*S. houtenae*). Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa isolat F25A dan F25B mempunyai pita protein yang sama dengan berat molekul 36,29 kDa yang diduga sebagai *S. enteritidis* atau *S. typhimurium*. Sehingga berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan adanya cemaran *Salmonella spp.* di lingkungan peternakan ayam dan diketahui adanya keanekaragaman *Salmonella spp*.

Kata kunci : isolasi, karakterisasi, *Salmonella spp.*, peternakan ayam broiler, SDS-PAGE

Isolation and Characterization of *Salmonella spp.*

From Broiler Poultry Farm In Malang

ABSTRACT

Salmonella spp. is one of microorganism that caused foodborne disease in broiler poultry products which can contaminate since in the poultry farm. *Salmonella spp.* transmission and contamination caused from less of implementation of biosecurity. The aim of this research was to analyze the presence and characteristic of *Salmonella spp.* in poultry farm. Faecal, feed, and water samples that were used in this research taken from poultry farm in Mertojoyo and Sawojajar, Malang. This research was conducted by standard microbiological method, biochemistry assay, serological assay, and SDS-PAGE to determine the protein profile of *Salmonella spp*. The result of bacteria characterization based on microbiological test, biochemistry assay, serological assay, and protein profile were analyzed descriptively and variation of *Salmonella spp.* were determined based on protein profile. The isolation result showed that there were *Salmonella spp.* contamination in faecal were, Mertojoyo $4{,}9 \times 10^8$ ±11,34 cfu/ml and Sawojajar $3{,}2 \times 10^8$ ±1,70 cfu/ml and in drink water was, Mertojoyo $5{,}8 \times 10^8$±16,36 cfu/ml and Sawojajar $3{,}8 \times 10^8$ ±4,82 cfu/ml. From phenotypic characterization of 5 isolates could be predicted that the isolates have similiarity with *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella sub genus* I (*S. kauffmannii; S. enterica; S. enteritidis*), *Salmonella sub genus* II (*S.salamae; S.dar-es-salaam*), *Salmonella sub genus* IV (*S. houtenae*). Based on the result of SDS PAGE showed that the F25A and F25B isolates has a functional protein bands with a molecular weight of 36,29 kDa which suspected as S. *enteriditis* and S. *typhimurium* protein. As the summary of this research, there were presenced and diversity of *Salmonella spp.* in poultry farm.

Keywords: isolation, characterization, *Salmonella spp.*, broiler poultry farm, SDS PAGE

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberi rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.* Di Lingkungan Peternakan Ayam Broiler Di Kota Malang**." Penelitian ini merupakan payung penelitian (Analisis Keragaman *Salmonella spp.* pada Rantai Produksi Karkas Unggas) yang diketuai oleh drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc. sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terimakasih terutama kepada:

1. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P, M. Biotech selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian dan penyelesain penulisan skripsi ini.
2. Dr. Dra. Herawati, M.P dan Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., M.P., M.Sc., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dan saran.
3. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh, MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
5. Ayahanda H. Sumarji, Ibunda Hj. Suenik S.Pd., adik Almirandari Ikawikanti dan Alvido Evan Krisnanda serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang, dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.
6. Bapak Arif dan Bapak Suyoto selaku pemilik peternakan di Sawojajar dan Mertojoyo yang telah membantu dalam penyediaan bahan baku sampel.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

7. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
8. Tim peneliti *Salmonella* khususnya Fitri Sandra Prastiwi dan Silvia Anjar Kusuma, keluarga Firdausi, sahabat-sahabat perjuangan GAMETOGENESIS 2008 atas persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan, dan mimpi-mimpi yang luar biasa.
9. Rizal Romadhon Iriawan atas semangat dan motivasinya yang selama ini diberikan.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Laporan Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Februari 2013

Penulis.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Cemaran *Salmonella spp.* pada Peternakan Ayam Broiler	4
2.2 *Salmonella spp.*	4
2.3 Infeksi *Salmonella spp.* Pada Unggas	6
2.4 Isolasi dan Identifikasi *Salmonella spp.*	8
2.5 *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)	11
BAB III KERANGKA OPERASIONAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Operasional Penelitian	14
3.2 Hipotesis Penelitian	15
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
4.2 Subjek Penelitian	16
4.3 Materi Penelitian	16
4.4 Tahapan Penelitian	17
4.4.1 Pengambilan Sampel	17
4.4.2 Isolasi *Salmonella spp.*	18
4.4.3 Karakterisasi *Salmonella spp.*	19
4.4.4 Analisis Profil Pita Protein menggunakan SDS-PAGE	19
4.5 Analisa Hasil Penelitian	20
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Cemaran *Salmonella spp.* Pada Feses, Pakan dan Air Minum	21
5.2 Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.*	25
5.3 Analisa Profil Pita Protein *Salmonella spp.*	30
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	33
6.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	41

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

2.1 Hasil Uji *Salmonella spp.* pada TSIA dan LIA 10
2.2 Hasil Uji Biokimia pada *Salmonella spp.*..... 11
5.1 Rerata Jumlah Bakteri *Salmonella spp.* Pada Feses, Pakan dan Air minum 21
5.2 Morfologi Bakteri *Salmonella spp.* 27
5.3 Karakteristik Uji Biokimia dan Uji Serologis Bakteri *Salmonella spp.* Pada Feses dan Air minum..... 28
5.4 Pengelompokan Dugaan Isolat *Salmonella spp.* Hasil Karakterisasi Berdasarkan Nilai Uji Similaritas dengan Isolat Acuan *Salmonella spp.* 30
5.5 Profil Protein Bakteri Salmonella spp. berdasarkan Berat Molekul Protein Hasil SDS PAGE dengan satuan (kDa)..... 31

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**
5.1 Morfologi Bakteri *Salmonella spp.* 26
5.2 Uji Similaritas Dengan Menggunakan Fenogram
Dugaan *Salmonella spp.* 29
5.3 Gambar Profil Pita Protein *Salmonella spp. spp* Hasil SDS PAGE 31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian	42
2. Langkah Kerja Penelitian	43
3. Pembuatan Reagen dan Media Penelitian	52
4. Dokumentasi Penelitian	58
5. Jumlah Koloni Bakteri *Salmonella spp.*	61
6. Profil Koloni Bakteri *Salmonella spp.*	62
7. Kurva Standar Berat Molekul Protein Marker	64
8. Berat Molekul Protein Isolat yang Terdeteksi	65

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
LPS	Lipopolisakarida
TTB	*Tetrathionate Broth*
BGA	*Brilliant Green Agar*
HEA	*Hektoen Enteric Agar*
LIA	*Lysine Iron Agar*
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis*
LAF	*Laminar Air Flow*
PW	*Peptone Water*

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi dan kontaminasi yang disebabkan oleh *Salmonella spp.* ditemukan hampir di seluruh dunia. Pada tahun 1991, di Belanda banyak didapatkan kontaminasi *Salmonella spp.* pada daging ayam dan telur. Demikian pula pada tahun 1994, dari 87% ternak kalkun di Kanada, ditemukan banyak yang positif *Salmonella spp.* (Myint, 2004). Di Indonesia, khususnya di Malang diketahui bahwa 3 dari 36 sampel hasil penelitian sampel karkas ayam broiler segar terdeteksi positif *Salmonella spp.* (Primajati, 2011).

Salmonella spp. dapat mencemari ayam sejak dari peternakan, dimana titik awal dari rantai penyediaan pangan asal ternak adalah kandang atau peternakan. Manajemen atau tata laksana peternakan akan menentukan kualitas produk ternak yang dihasilkan. Oleh karena itu, biosekuriti di peternakan harus terlaksana dengan baik agar cemaran mikroba dapat diminimalkan (Ferreira, *et al.*, 2003).

Kontaminasi bakteri dalam pangan dapat menurunkan kualitas pangan dan mengakibatkan bahan pangan yang berasal dari hewan mudah rusak. Jika manusia mengkonsumsi bahan makanan tersebut dapat menimbulkan penyakit. (Budinuryanto, *et al.*, 2000). *Salmonella spp.* dapat menyebabkan salmonellosis, yang dapat menyerang hewan maupun manusia. Salmonellosis pada manusia terdiri dari tifoid dan non tifoid. Penyakit ini dapat ditularkan melalui makanan asal hewan yang terkontaminasi oleh *Salmonella spp.* (*foodborne disease*). Salmonellosis bersifat endemis hampir di seluruh kota besar di wilayah Indonesia. Diperkirakan demam tifoid terjadi sebanyak 60.000 hingga 1.300.000 kasus

dengan sedikitnya 20.000 kematian per tahun. (Suwandono, *et al.*, 2005). Feses merupakan ekskresi atau keluaran dari saluran pencernaan yang dapat menjadi sumber penularan *Salmonella spp.*. Makanan yang kurang sempurna pemasakannya dapat juga sebagai sumber penularan *Salmonella spp.*.

Pencegahan masuknya infeksi *Salmonella spp.* sangat penting dilakukan untuk menjaga kesehatan unggas dan industri makanan (Carli *et al.*, 2001). Hewan yang terinfeksi di peternakan harus secepatnya di identifikasi dan diisolasi dari yang lain untuk mencegah dan mengendalikan penyebaran infeksi. Oleh karena itu kontrol dalam mengurangi kontaminasi *Salmonella spp.* pada unggas dimulai dari peternakan (Ferretti, *et al.*, 2001;Weeks, *et al.*, 2002). Metode untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Salmonella spp.* adalah metode *selective enrichment* dan *plating* serta diikuti dengan uji biokimia (Bennasar, *et al.*, 2000; Burtscher, *et al.*, 1999; Chiu *and* Jonathan, 1996). Beberapa teknik dapat digunakan untuk mendeteksi serovar *Salmonella spp.*, seperti menggunakan *selective culture medium*. Untuk mengetahui variasi *Salmonella spp.* dilakukan teknik SDS-PAGE untuk melihat profil pita protein dan berat molekulnya. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini penting untuk dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui adanya cemaran *Salmonella spp.* serta mengetahui variasi *Salmonella spp.* yang ada di lingkungan peternakan ayam broiler, meliputi feses ayam, pakan dan air minum yang diambil di tempat minum.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat cemaran *Salmonella spp.* di lingkungan peternakan ayam broiler di kota Malang?
2. Bagaimana karakteristik *Salmonella spp.* yang diisolasi dari feses ayam, pakan dan air minum berdasarkan uji biokimia, uji serologis dan profil pita protein?

1.3 Batasan Masalah

1. Pengambilan sampel dilakukan di dua tempat peternakan ayam broiler di kota Malang yaitu di peternakan ayam di Mertojoyo dan Sawojajar.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah feses ayam, pakan dan air minum yang diambil di tempat minum.

1.4 Tujuan

1. Untuk mengetahui adanya cemaran *Salmonella spp.* pada lingkungan peternakan ayam broiler di kota Malang.
2. Untuk mengetahui karakteristik *Salmonella spp.* yang diisolasi dari feses ayam, pakan dan air minum berdasarkan uji biokimia, uji serologis dan profil pita protein.

1.5 Manfaat

Memberikan informasi tentang adanya cemaran *Salmonella spp.* yang ada di lingkungan peternakan ayam broiler di kota Malang. Menjadi acuan untuk dilakukan penelitian selanjutnya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cemaran *Salmonella spp.* pada Peternakan Ayam Broiler

Transmisi dan kontaminasi *Salmonella spp.* dapat terjadi karena tidak higienisnya kegiatan di peternakan. Kurangnya biosekuriti yang memadai dan perpindahan burung-burung dari satu peralatan ke peralatan yang lain dapat memperburuk kondisi di peternakan. Menurut beberapa peneliti, tikus, burung liar, semut dan ular merupakan agen utama dalam transmisi *Salmonella spp.* (Angen *et al*., 1996; Carrique-Mas *et al*., 2009; Davies *et al*., 1997). Untuk mengetahui tingkat kontaminasi *Salmonella spp*. di peternakan ayam broiler, sampel yang bisa diambil di peternakan menurut kondisi lingkungannya adalah feses, tanah, debu, kotoran, sampah, tempat pakan, tempat minum (Mallinson *et al*., 2000; Wales *et al*., 2006).

Biosekuriti merupakan sistem produksi suatu peternakan unggas dalam mengurangi resiko dan konsekuensi dari masuknya penyakit infeksius terhadap unggas maupun manusia. Biosekuriti merupakan semua praktek-praktek manajemen yang diberlakukan untuk mencegah organisme penyebab penyakit ayam yang masuk dan keluar peternakan (Payne, 2000).

Menurut Jeffrey., (2006), penerapan biosekuriti pada peternakan unggas dibagi menjadi tiga bagian utama, yaitu (1) isolasi, (2) pengendalian lalu lintas, dan (3) sanitasi :

1) Isolasi : Isolasi mengandung pengertian penempatan atau pemeliharaan hewan di dalam lingkungan yang terkendali. Pengandangan atau pemagaran kandang akan menjaga dan melindungi unggas serta

menjaga masuknya hewan lain ke dalam kandang. Isolasi ini diterapkan juga dengan memisahkan ayam berdasarkan kelompok umur. Selanjutnya, penerapan manajemen *all-in/all-out* pada peternakan besar mempraktekan depopulasi secara berkesinambungan, serta memberi kesempatan pelaksanaan pembersihan dan desinfeksi seluruh kandang dan peralatan untuk memutus siklus penyakit (Jeffrey., 2006).

2) Pengendalian lalu lintas : Pengendalian lalu lintas ini diterapkan terhadap lalu lintas ke peternakan dan lalu lintas di dalam peternakan. Pengendalian lalu lintas ini diterapkan pada manusia, barang, dan bahan (Jeffrey., 2006).

3) Sanitasi : Sanitasi ini meliputi praktek desinfeksi bahan, manusia, dan peralatan yang masuk ke dalam peternakan, serta kebersihan pegawai di peternakan (Jeffrey., 2006).

2.2 *Salmonella spp.*

Salmonella spp. berdasarkan taksonominya dapat digolongkan sebagai berikut (Brenner, 2000):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Ptoteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: *Salmonella*
Spesies	: *Salmonella spp.*

Salmonella spp. adalah bakteri yang merupakan anggota famili Enterobacteriaceae, Gram negatif, berbentuk batang, tidak berspora, motil (kecuali *S. pullorum* dan *S. gallinarum*), memiliki flagela peritrikus, bersifat

anaerob fakultatif, tumbuh pada suhu antara 5-45 °C, dengan suhu optimum 35-37°C. *Salmonella spp.* mampu tumbuh pada pH rendah dan umumnya sensitif pada kadar garam yang meningkat. *Salmonella spp.* membentuk rantai filamen yang panjang jika dibiakkan/ditumbuhkan pada suhu ekstrim 4-8 °C atau 44 °C, serta pada pH 4.4 atau 9.4. Semua *Salmonella spp.* merupakan patogen intraselular fakultatif dan bersifat patogen, serta dapat menyerang makrofag, sel-sel dendrit, dan epitel. Spesies *Salmonella spp.* dibagi menjadi beberapa serotipe yang didasarkan pada lipopolisakarida (O), protein flagelar (H), dan antigen kapsular (Vi). Habitat *Salmonella spp.* adalah di saluran pencernaan (usus halus) manusia dan hewan. (Bhunia, 2008).

Menurut Brenner *et al,*. (2000), komponen utama dari permukaan *Salmonella spp.* terdiri dari flagela (disebut antigen H), dan lipopolisakarida (disebut antigen O). Kedua antigen ini sering menyebabkan reaksi silang diantara mikroba genus *Salmonella spp.*. Beberapa strain *Salmonella spp.* dapat bertahan dari aktivitas fagositosis karena adanya mutasi pada gen lipopolisakarida dan kehilangan antigen O nya. *Salmonella spp.* merupakan salah satu bakteri yang bersifat patogen, dan merupakan agen penyebab *foodborne disease. Foodborne disease* adalah suatu penyakit yang merupakan hasil dari pencemaran dan penyerapan makanan yang mengandung mikroba oleh tubuh manusia, mikroba masuk ke dalam saluran pencernaan manusia melalui makanan, yang kemudian diserap oleh tubuh, sehingga menyebabkan gejala penyakit (Gustiani, 2009). *Salmonella spp.* bersifat patogen karena dindingnya memiliki struktur LPS (lipopolisakarida). Karkas ayam merupakan salah satu bahan pangan yang

bertindak sebagai sumber penularan Salmonellosis pada manusia (Andriani dkk, 2003).

Salmonella spp. di kelompokkan berdasarkan antigen atau primer spesifik, yaitu kelompok I *enteric*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *houtenae*, IV *diarizonae*, V *bongori*, dan VI *indica*. (Todar, 2008). Namun klasifikasi atau penggunaan tatanama yang sering dipakai pada *Salmonella spp.* berdasarkan epidemiologi, jenis inang, dan jenis struktur antigen (misalnya *S.typhi, S .typhimurium*). Jenis atau spesies *Salmonella spp.* yang utama adalah *S. typhi* (satu serotipe), *S. choleraesuis*, dan *S. enteritidis* (lebih dari 1500 serotipe). Sedangkan spesies *S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. paratyphi C* termasuk dalam *S. enteritidis* (Jawezt *et al.*, 2008).

2.3 Infeksi *Salmonella spp.* Pada Unggas

Unggas yang terinfeksi *Salmonella spp.* sering menunjukkan gejala subklinis sehingga bakteri ini cenderung menyebar dengan mudah di antara *flock* atau kumpulan ternak. Selain itu, hewan dapat menjadi pembawa penyakit (*carrier*) yang persisten, sehingga prevalensi kejadian *Salmonella spp.* tidak mudah dideteksi, kecuali melalui pengambilan dan pemeriksaan sampel yang rutin (Namata *et al.* 2005). Unggas yang sakit akan mengeluarkan bakteri *Salmonella spp.* melalui fesesnya.

Pada peternakan ayam, feses dari unggas yang sakit akan mencemari kandang dan lantai/alas kandang. *Salmonella spp.* yang masih tertinggal pada lingkungan kandang mampu bertahan pada suhu 5-47 °C dan akan sangat optimal pada suhu 35-37 °C, dengan pH antara 4-9. Selain itu infeksi *Salmonella spp.* dapat terjadi karena adanya infeksi pendahuluan seperti *E. tenella*, *E. maxima*, dan

E. acervulina yang akan meningkatkan kemampuan kolonisasi beberapa serotype seperti *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. agona* dan *S. infatis* pada saluran intestinal (Gast, 1997). Jalur infeksi atau cemaran terpenting *Salmonella enterica* adalah di pembibitan, yang mana infeksi diturunkan secara vertikal ke dalam telur tetas. Sumber lain infeksi *Salmonella spp.* pada unggas adalah pakan yang tercemar, rodensia, cacing, dan hewan liar (Humphrey, 2006).

Pada ayam petelur, infeksi *S. enteritidis* pada induk petelur diawali dengan masuknya bakteri melalui pakan atau air minum. Selanjutnya bakteri tersebut memperbanyak diri dalam saluran pencernaan maupun peritoneum (Alisantosa *et al*., 2000; Shivaprasad *et al*.; 1990). Bakteri kemudian menembus dinding usus sehingga menimbulkan reaksi inflamasi, selanjutnya dapat menembus mukosa masuk ke dalam sistem pertahanan limfatik dan dapat mencapai saluran darah sehingga dapat menyebabkan bakteremia atau abses (Supardi dan Sukamto, 1999). Selanjutnya bakteri tersebut akan menyebar ke organ lain seperti organ reproduksi (ovarium dan oviduk). Diduga bakteri tersebut dibantu oleh makrofag yang terdapat pada saluran pencernaan.

Infeksi *S. enteritidis* pada ovarium induk ayam petelur dapat menyebabkan penularan *S.enteritidis* secara vertikal (transovarial) ke telur ayam yang dihasilkan sehingga anak ayam yang ditetaskan dapat bertindak sebagai pembawa *S. enteritidis*. Anak ayam tersebut akan tumbuh dan berkembang menjadi dara atau induk dewasa yang dapat menyebabkan kontaminasi telur selanjutnya (Harakudo *et al*., 2001; Thiaragrajan *et al*., 1994; Wang dan Slavik, 1998).

2.4 Isolasi dan Identifikasi *Salmonella spp.*

Pemeriksaan feses, pakan, air minum yang diambil di tempat minum dan bahan lain di sekitarnya perlu menjadi sampel untuk mendeteksi adanya cemaran bakteri *Salmonella spp*.

Media untuk isolasi *Salmonella spp.* adalah media selektif seperti agar *Salmonella.-Shigella* (SS), *Xylose LysineDeoxycholate* (XLD), dan *Hektoen Eenteric Agar* (HEA). Untuk mengidentifikasi *Salmonella spp.* dapat menggunakan teknik biakan konvensional. Menurut Adams *and* Moss., (2000) terdapat tahapan prosedur yang sudah ditetapkan untuk mengidentifikasi *Salmonella spp.*, yaitu tahap *pre-enrichment* (pra-pengayaan), *selective enrichment* (pengayaan selektif), uji biokimia, dan uji serologis.

1) Tahap *pre-enrichment* pada media non-selektif merupakan tahapan yang bertujuan untuk meningkatkan perbaikan sel *Salmonella spp.* dengan cara memperbaiki sel-sel yang mengalami kerusakan subletal. Kerusakan subletal dapat diakibatkan dari kondisi yang merugikan selama proses pengolahan makanan, seperti pendinginan, pembekuan atau pengeringan (Adams *and* Moss, 2000).
2) Tahap *selective enrichment* dilakukan untuk meningkatkan perbandingan jumlah *Salmonella spp.* dalam jumlah total mikroorganisme yang diinokulasi melalui peningkatan proliferasi *Salmonella spp.* dan menekan pertumbuhan bakteri lain. Bahan selektif yang digunakan yaitu empedu, *brilliant green, tetrathionate,* dan *selenite cystine broth*. Media yang sering digunakan adalah *selenite-cystine* (SC) *broth* yang berisi cystine untuk menstimulasi pertumbuhan *Salmonella spp., Müller-Kauffman*

tetrathionate broth (TTB) yang mengandung *tetrathionate, brilliant green*, empedu, dan *Rappaport-Vassiliadis* (RV) *broth* yang berisikan *malachite green, magnesium chloride* ($MgCl_2$), dan pH lebih rendah (Adams & Moss 2000). Kemudian dilanjutkan pada media agar selektif yang berfungsi untuk menumbuhkan *Salmonella spp.* ada beberapa macam media selektif untuk *Salmonella spp.* yaitu media *brilliant green agar* (BGA), *hektoen enteric agar* (HEA), dan *xylose lysine deoxycholate* (XLD) *agar* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Koloni *Salmonella spp.* pada media selektif BGA, HEA, dan XLD didapatkan setelah 24-48 jam inkubasi. Hasil yang diharapkan pada media ini adalah ketidakmampuan *Salmonella spp.* untuk memfermentasi laktosa dan atau memproduksi hidrogen sulfida (Adams *and* Moss, 2000). Keberhasilan tahap *enrichment* merupakan tahapan yang menentukan dalam deteksi *Salmonella spp.*.

3) Uji biokimia dilakukan untuk lebih mengetahui genus *Salmonella spp.*. Adapun uji konfirmasi biokimia dapat menggunakan media *triple sugar iron agar* (TSIA) dan *lysine iron agar* (LIA). Berikut adalah interpretasi hasil uji pada media TSIA dan LIA :

Tabel 2.1 Hasil Uji *Salmonella spp.* pada TSIA dan LIA (SNI, 2008).

Media	Agar miring (Slant)	Dasar agar (Buttom)	H_2S	Gas
TSIA	Alkalin / K (merah)	Asam / A (kuning)	Positif (Hitam)	Negatif / positif
LIA	Alkalin / K (Ungu)	Alkalin / A (Ungu)	Positif (Hitam)	Negatif / positif

Semua biakan yang memberikan reaksi positif pada uji TSIA dan LIA akan disimpan sebagai isolat yang berpotensi sebagai *Salmonella spp.* dan

dilanjutkan ke uji biokimia dan uji serologi. Berikut ini adalah interpretasi hasil pada uji biokimia :

Tabel 2.2 Hasil Uji Biokimia pada *Salmonella spp.* (SNI, 2008).

Pengujian	Hasil reaksi		Reaksi *Salmonella spp.*
	Positif	Negatif	
Uji *urease*	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	Negatif
Uji *methyl red* (MR)	Warna merah menyebar	Warna kuning menyebar	Positif
Uji Citrate	Dari hijau- biru	Tidak ada perubahan warna	Positif
Uji *phenol red lactose broth*	Warna kuning atau ada gas	Tidak ada perubahan warna dan gas	Negatif
Uji *phenol red sucrose broth*	Warna kuning atau ada gas	Tidak ada perubahan warna dan gas	Negatif
Uji *katalase*	Timbulnya gelembung gas	Tidak ada gelembung gas	Positif

4) Uji serologi dengan uji *polyvalent* O dan *flagellar* H

Pada uji serologi bakteri sering kali dibagi menjadi beberapa serogroup atau beberapa serotype atas dasar perbedaan struktur antigen yang dimiliki dengan menggunakan serum yang diketahui Tes aglutinasi ini dapat digunakan dengan 2 cara berikut ini.

a) Tes aglutinasi pada gelas obyek.

Pada tes ini serum yang diketahui dicampur dengan biakan yang tidak diketahui pada gelas obyek. Reaksi positif ditandai dengan terjadi penggumpalan (*clumping)* dalam beberapa menit. Tes ini terutama digunakan untuk mengidentifikasi awal dari biakan.

b) Tes aglutinasi dilusi tabung (Tes Widal)

Pada infeksi *Salmonella typhi*, antibodi aglutinin di dalam serum meningkat dengan tajam selama minggu kedua dan ketiga. Untuk

keperluan diagnosis laboratorium, maka paling tidak diperlukan dua spesimen serum.

2.4 *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan metode yang sering digunakan untuk menganalisis kemurnian protein secara kualitatif. Metode ini dilakukan untuk memonitor hasil purifikasi protein dan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul. (Walker, 2009). Elektroforesis adalah gerakan partikel (koloid) yang memiliki muatan listrik melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik (Aulanni'am, 2005). Penambahan SDS pada gel poliakrilamid menghasilkan SDS-PAGE yang digunakan untuk sampel terdenaturasi. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) merupakan detergen ionic dan bersama dengan *β-merkaptoetanol* yang dilanjutkan dengan pemanasan akan merusak struktur tiga dimensi protein melalui pemecahan ikatan disulfide menjadi gugus sulfidril. SDS-PAGE digunakan pada pH netral, dimana pada pH 7 SDS akan membentuk kompleks negatif dengan protein (Svendsen *et al.*, 1994). Protein dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini akan dapat dipisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan bantuan protein standar (marker) yang telah diketahui berat molekulnya melalui perbandingan nilai mobilitas relatif (Rf) (Lehninger, 2004).

Gel poliakrilamid tersusun atas monomer monoakrilamid yang membentuk ikatan silang dengan bantuan ammonium persulfat (APS) dan N,N,N,N *tetramethylethylenediamine* (TEMED). Ukuran pori gel poliakrilamid bergantung pada konsentrasi akrilamid. SDS-PAGE terdiri dari 2 gel yaitu

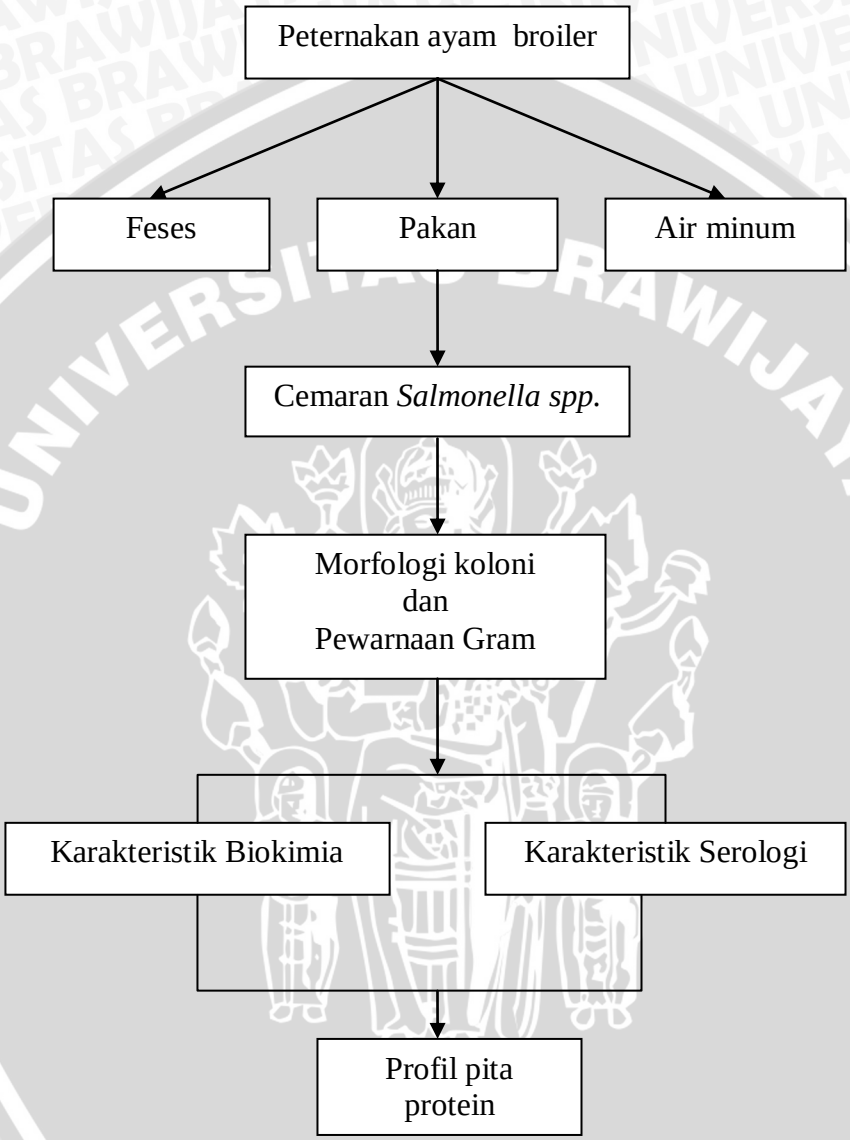
stacking gels dan *separating gels*. *Stacking gels* memiliki kandungan akrilamid yang lebih rendah sehingga memiliki pori yang lebih besar. *Stacking gels* berfungsi sebagai media agar protein terdenaturasi yang telah bermuatan negatif bergabung atau berasosiasi membentuk elips masuk ke dalam *separating gel*. *Separating gels* yang memiliki pori yang lebih kecil kemudian akan memisahkan protein berdasarkan ukuran. Protein yang berukuran lebih kecil akan lebih cepat melewati pori-pori pada *separating gels* (Walker, 2009).

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dilakukan dengan posisi berdiri, dimana pada bagian bawah gel diberi buffer anoda (bermuatan positif) dan dibagian atas gel diberi buffer katoda (bermuatan negatif). Kompleks protein-SDS yang telah bermuatan negatif akan bergerak melewati gel poliakrilamid menuju anoda dengan bantuan medan listrik dan buffer elektroforesis. Laju pergerakan protein bergantung pada ukuran pori dan kekuatan medan listrik. Setelah dilakukan elektroforesis, gel divisualisasi dengan pewarnaan. Pewarnaan protein dalam gel dapat dilakukan dengan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* R-250. Dengan pewarnaan, protein dalam gel poliakrilamid akan terlihat membentuk band atau pita yang terpisah berdasarkan ukurannya masing-masing (Walker, 2009).

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis merupakan standar pengujian terhadap berat molekul protein. *Sodium Dodecyl Sulphate polyacrilamid Gel Electrophoresis* juga merupakan standar pengujian terhadap struktur sub unit dan kemurnian protein. Teknik ini banyak digunakan karena sederhana dan sampel yang digunakan relatif sedikit (Lodish *et al*, 2001).

BAB 3 KERANGKA TEORI DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori Penelitian



Pengisolasian *Salmonella spp.* dapat dilakukan melalui pengoleksian sampel feses, pakan dan air minum. Dari ketiga sampel tersebut dapat diketahui apakah pada peternakan ayam tersebut terdapat cemaran *Salmonella spp*. Setelah *Salmonella spp.* diisolasi, dilakukan identifikasi dan karakterisasi. Identifikasi bakteri untuk mengetahui sifat dan morfologi koloni dilakukan dengan uji morfologi. Kemudian dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui morfologi bakteri. Untuk mengetahui karakterisasi bakteri dilakukan uji biokimia dan uji serologi, dan untuk mengetahui keanekaragaman profil pita protein setiap isolat bakteri dilakukan analisis SDS-PAGE. Hasil dari analisis profil protein yang didapat kemudian dicocokkan dengan hasil pendugaan isolat bakteri *Salmonella spp.* berdasarkan nilai uji similaritas.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat *Salmonella spp.* di lingkungan peternakan ayam broiler di kota Malang.
2. Terdapat keanekaragaman *Salmonella spp.* pada lingkungan peternakan ayam broiler di kota Malang yang ditandai dengan adanya variasi sifat biokimia dan profil pita protein.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan penelitian di laboratorium berlangsung selama 5 bulan mulai bulan Mei-September 2012.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah *Salmonella spp.* yang diisolasi dari sampel feses ayam, pakan, air minum yang diambil dari tempat minum. Sampel tersebut masing-masing dimasukkan ke dalam wadah steril pada suhu 5ºC untuk mencegah kontaminasi bakteri.

4.3 Materi Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, tabung *polypropilen*, tabung durham, *backer glass*, tabung erlemenyer, gelas ukur, mikropipet, *blue tip*, *yellowtip*, mikropipet, botol media, pengaduk kaca, gunting, pinset, mikromilifilter, aluminium foil, plastik wrap, jarum inokulasi (*ose*), pembakar bunsen, timbangan (Metter toledo), *magnetic stirer*, pH meter (3210 Set 2), pengocok tabung (vortex) (Maxi mix II), inkubator (MMM Medcenter), LAF (*Laminar Air Flow*) (Nuaire Labgard Class II), penangas air, autoklaf, lemari steril (*clean bench*), lemari pendingin (*refrigerator*), *freezer*, mikroskop cahaya (Olympus TL2), foto digital mikroskopik (Olympus CX 41), *object glass*, *eppendorf*, sonikator (Branson 200), *power supply* (Bio-Rad), mini protean 3 (Bio-Rad) , timer, *shaker*.

Media dan reagen yang digunakan adalah *Peptone Water* (Oxoid L 37 Himedia REF RM 001-500G), *aquades*, *Selenite Cystine Broth* (Oxoid), *Triple Sugar Iron Agar* (Oxoid CM 025777), , *Methyl Red* (Oxoid CM 0043), *Simmon Citrate Agar* (Oxoid), *Urea* (Oxoid K 25031287 945), ekstrak *Yeast* (Oxoid LP 0021), Na_2HPO_4 (Merck M.1.06586.500), *phenol red*, ekstrak *beef* (Hiebdia RM 002-500G), *lactose* (Merck 1.07657.1000), *sucrose* (Merck 316 K 19271151), akuades, *maltose* (Merck K 20188911), *manitol*, MRVP medium (Oxoid CM 0043), *Xylose Lysine Desoxycholate* (Difco 278850; Oxoid CM 0469), *Nutrient Agar* (Oxoid CM 0003), Nutrient Broth (Himedia REF RM 002-500G), Natrium Clorida (NaCl) (Merck K 34022504 448), *Oksidase kit* (Oxoid BR 064A), gliserol (Merck K 20663194), larutan kristal violet, *lugol*, *aceton alkohol*, *safranin*, H_2O_2 3%, *Salmonella polyvalent somatic* O (Murex 5509 30855), Gel *Polyacrylamide*, *phosphate buffer* (PBS), *ethanol absolut* (EtOH), Tris-HCl, 0,3% Tris, 1,44% *glycine*, 0,1% SDS, marker *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder Plus* (10 hingga 250 kDa) (SM 1811), larutan *staining* : *Coomassie blue R-250, 50% methanol, 10 % acetic acid*, larutan *destaining* : *25 % Methanol, 10 % acetic acid.*

4.4 Tahapan Penelitian

4.4.1 Pengambilan sampel

Sampel diambil dari dua peternakan, yaitu peternakan Bapak Suyoto di daerah Mertojoyo dan Bapak Arif di daerah Sawojajar. Sampel feses ayam dan pakan sebanyak 10 g, sedangkan air minum sebanyak 10 ml dikoleksi secara aseptis dan dimasukkan ke dalam botol steril pada suhu 5°C.

4.4.2 Isolasi *Salmonella spp.* (metode SNI 2897:2008)

Metode mikrobiologi isolasi bakteri yang dilakukan sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 2897:2008. Untuk tahap *pre-enrichment* (pra-pengayaan), sampel yang telah dikoleksi dilakukan pengenceran secara berseri (10^{-1},10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4},10^{-5},$10^{-6,}$ 10^{-7}) menggunakan *pepton water* steril. Pada tahap *enrichment* (pengayaan), hasil pengenceran 10^{-3}, 10^{-5}, dan 10^{-7} ditanam pada media selektif *Selenite Cystine Broth* (SCB) steril, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dari tahap *enrichment* (pengayaan) pada pengenceran 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} diambil 1 ml ditanam pada media selektif *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD). Hasil koloni yang tumbuh dilakukan perhitungan koloni serta pengamatan morfologi koloni. Pemurnian bakteri dengan menggunakan teknik penggoresan kuadran pada media XLD agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Target pemurnian adalah koloni yang memiliki morfologi koloni berbeda dan termasuk kedalam bakteri Gram negatif. Selanjutnya dipilih 2 jenis koloni untuk dilakukan karakterisasi koloni dan bakteri. Setiap koloni dibuat duplo sehingga diperoleh 40 isolat yang berasal dari feses peternakan Mertojoyo dan feses peternakan Sawojajar, pakan peternakan Mertojoyo dan pakan peternakan Sawojajar, air minum peternakan Mertojoyo dan air minum peternakan Sawojajar. Hasil pemurnian ditumbuhkan pada agar miring media *Nutrient Agar* (NA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan disimpan pada suhu -20°C sebagai *stock culture.* Penyimpanan isolat murni bakteri dengan penambahan gliserol 60% dengan perbandingan 1:1 pada suhu -80°C.

4.4.3 Karakterisasi *Salmonella spp.*

Karakterisasi terhadap isolat *Salmonella spp.* bertujuan untuk mengetahui sifat morfologi dan biokimia. Untuk mengetahui sifat morfologi bakteri secara mikroskopis dilakukan pewarnaan gram. Sedangkan karakterisasi secara biokimiawi yang dilakukan antara lain : Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), Uji Katalase, Uji Oksidase, Uji *Urease*, Uji *Methyl Red (MR)*, Uji *Citrate*, Uji *Phenol Red Lactose Broth*, Uji *Phenol Red Sucrose Broth*, Uji Manitol, Uji Maltosa, dan Uji Serologis. Prosedur melakukan uji dapat dilihat pada Lampiran 2. Pendugaan isolat bakteri *Salmonella spp.* berdasarkan nilai uji similaritas yang menggunakan metode UPGMA *(Unwighted pair group method using arithmetic averages)* untuk mengetahui isolat sampel dan data isolat acuan adalah sama, untuk penguat dari pendugaan atau pengelompokan isolat.

4.4.4 Analisis Profil Pita Protein dengan menggunakan SDS-PAGE

Metode analisa SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphat-Polyacrylamic Gel Electrophoresis)* dengan ekspresi profil protein yang berbeda dapat digunakan untuk mendukung hasil uji morfologi dan biokimia dari isolat bakteri *Salmonella spp*. Dalam melakukan analisa profil protein *Salmonella spp.*, hanya isolat yang pada uji biokimia menunjukkan hasil positif *Salmonella spp.* yang akan dipilih berdasarkan nilai uji *similaritas* bernilai 1,000, untuk mengetahui profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE. Analisa profil protein menggunakan SDS-PAGE diawali dengan melakukan preparasi sampel protein dengan melakukan isolasi protein bakteri, elektroforesis SDS-PAGE dan analisa profil protein berdasarkan berat molekul. Langkah kerja analisis protein *Salmonella spp.* dapat dijelaskan pada Lampiran 2.

Hasil dari analisis profil protein yang didapat kemudian dicocokkan dengan hasil pendugaan isolat *Salmonella spp.* berdasarkan nilai uji similaritas yang menggunakan metode UPGMA *(Unwighted pair group method using arithmetic averages)* sebagai penguat dari pendugaan atau pengelompokan isolat.

4.5 Analisa Hasil Penelitian

Penelitian ini dianalisis secara deskriptif dari hasil isolasi, karakterisasi *Salmonella spp.* dan mengetahui karakterisasi profil pita protein.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Cemaran *Salmonella spp.* Pada Feses, Pakan dan Air Minum

Pengambilan sampel dilakukan dari feses, pakan, dan air minum yang diambil dari tempat minum yang berasal dari peternakan ayam broiler di Mertojoyo dan Sawojajar. Data hasil perhitungan *Total Plate Count* (TPC) secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 5. Rerata jumlah koloni (*cfu*/ml) pada sampel feses, pakan dan air minum disajikan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rerata Jumlah Koloni *Salmonella spp.* pada feses, pakan dan air minum

No	Tempat	Jumlah rerata koloni(*cfu/ml*)*		
		Feses	Pakan	Air minum
1.	Mertojoyo	$4{,}9 \times 10^8 \pm 11{,}34$	**	$5{,}8 \times 10^8 \pm 16{,}36$
2.	Sawojajar	$3{,}2 \times 10^8 \pm 1{,}70$	**	$3{,}8 \times 10^8 \pm 4{,}82$

* Rerata jumlah bakteri dihitung dari duplikat sampel yang ditanam pada cawan yang diduplikat dengan 3 kali ulangan.
** Menunjukkan tidak terdeteksi pada pengenceran 10^{-3}

Berdasarkan Tabel 5.1 dapat diketahui bahwa pada peternakan ayam didapatkan adanya cemaran *Salmonella spp.* pada feses dan air minum dengan jumlah koloni tertinggi ditemukan pada air minum dan feses di peternakan Mertojoyo sebanyak $5{,}8 \times 10^8 \pm 16{,}36$ dan $4{,}9 \times 10^8 \pm 11{,}34$, tetapi pada sampel pakan tidak ditemukan adanya cemaran *Salmonella spp.*. Pada peternakan ayam di Sawojajar juga ditemukan adanya cemaran *Salmonella spp.* tetapi tidak sebanyak yang ditemukan di peternakan ayam Mertojoyo, dengan jumlah koloni yang ditemukan pada air minum adalah $3{,}8 \times 10^8 \pm 4{,}82$ dan pada feses $3{,}2 \times 10^8 \pm 1{,}70$. Hal ini tidak sesuai dengan syarat yang telah ditetapkan SNI 7388:2009 yang menyatakan bahwa batas maksimum cemaran mikroba dengan jumlah *Salmonella spp.* yaitu negatif pada setiap sampel.

Cemaran *Salmonella spp.* yang diisolasi dari feses dan air minum pada peternakan Mertojoyo lebih tinggi daripada di peternakan Sawojajar dikarenakan biosekuriti yang kurang diterapkan di peternakan Mertojoyo. Biosekuriti tidak bisa berjalan dengan baik tanpa ditunjang sanitasi dan higiene yang baik. Hal yang paling penting adalah menjaga agar jangan sampai ada agen-agen penyakit yang masuk dari luar ke dalam wilayah peternakan. Agen-agen penyakit harus dicegah agar tidak menyebar sehingga tidak membahayakan bagi populasi ayam tersebut (Shulaw *and* Bowman, 2001). Penerapan sanitasi kandang pada kedua peternakan adalah mengosongkan kandang dari ayam periode sebelumnya, membersihkan kandang dari segala jenis kotoran yang berasal dari periode sebelumnya (misalnya: feses, bulu-bulu ayam, debu). Kandang diberi insektisida, alat-alat kandang (tempat pakan, tempat minum) didesinfeksi, tetapi kedua peternakan ini tidak menerapkan program kebersihan lingkungan tersebut secara teratur. Dokumentasi gambar keadaan kandang pada masing-masing lokasi dapat dilihat pada Lampiran 4. Menurut Jeffrey., (2006) prosedur penerapan sanitasi kandang yang baik memiliki beberapa tahapan, yaitu (1) mengosongkan kandang dari ayam periode sebelumnya, (2) membersihkan kandang dari segala jenis kotoran yang berasal dari periode sebelumnya (misalnya: feses, bulu-bulu ayam, debu). Hal ini menjadi sangat penting karena kotoran dari periode sebelumnya banyak mengandung mikroorganisme dan akan sangat rentan terpapar ayam yang baru masuk, apalagi ayam tersebut masih DOC yang imunitasnya rendah, (3) setelah kandang bersih sepenuhnya dari kotoran, dilakukan pembasmian kutu-kutu kandang dengan insektisida, perendaman dengan disinfektan, kemudian dilakukan pengapuran, (4) alas kandang ditaburi sekam/serutan kayu (*litter*). Setelah

ditaburi, didesinfeksi dengan antikoksidia, (5) Desinfeksi juga dilakukan terhadap alat-alat kandang (tempat pakan, tempat minum, dan sebagainya), (6) Menjaga kebersihan lingkungan sekitar kandang dengan melakukan penyemprotan desinfektan secara berkala.

Penerapan prosedur desinfeksi untuk kendaraan dan pengunjung belum dilakukan. Pada kedua peternakan ini tidak terdapat kolam *dipping* dan tempat *spraying*. Hal ini disebabkan karena belum adanya aturan biosekuriti yang ketat. Menurut Stanton., (2004) setiap peternakan seharusnya memiliki kolam *dipping* untuk kendaraan dan orang, serta tempat *spraying* untuk kendaraan, orang, dan peralatan pada pintu masuk area peternakan. Bahan aktif yang digunakan bersifat tidak iritan terhadap kulit, tidak beracun, dan ampuh dalam membasmi mikroorganisme.

Hasil observasi pada kedua peternakan ini menunjang hasil penelitian dari Saadah dkk., (2010) bahwa tindakan biosekuriti yang masih sangat rendah pada peternakan unggas pedaging adalah pada kegiatan sanitasi. Rendahnya kegiatan sanitasi ini mengisyaratkan bahwa kesadaran dan kebiasaan peternak untuk menjaga kebersihan kandang dan sekitarnya masih kurang serta penggunaan desinfektan masih sangat kurang.

Cemaran *Salmonella spp.* pada feses tidak dikarenakan pakan yang digunakan. Pakan yang digunakan di dua peternakan ini adalah pakan organik yang terbuat dari tepung jagung, sehingga bakteri yang didapatkan dari feses adalah dari saluran pencernaan ayam itu sendiri, karena habitat bakteri *Salmonella spp.* adalah pada saluran pencernaan. Hal ini sesuai dengan yang disampaikan Humphrey., (2006)

Salmonella spp. memperbanyak diri dalam saluran pencernaan hewan yang terinfeksi maupun hewan pembawa yang selanjutnya dikeluarkan melalui feses. Feses yang tercemar bakteri ini dapat mencemari makanan dan lingkungan.

Cemaran *Salmonella spp.* pada air minum ini disebabkan karena kondisi air minum yang keruh dikarenakan tidak dilakukan penggantian air selama 2 hari dan biosekuriti peternakan yang kurang diterapkan. Kedua peternakan ini menggunakan air tanah sebagai air minum, tetapi tidak menambahkan klorin pada air minumnya. Klorinasi berguna untuk mematikan mikroorganisme yang terkandung dalam sumber air. Penambahan klorin ini dilakukan sebagai sanitasi air minum untuk ayam, tetapi saat ini banyak produk komersial lain menggunakan asam organik untuk sanitasinya. Air minum yang diberikan kepada ayam pada dua peternakan ini tidak melalui proses klorinasi maupun pemberian asam organik. Menurut Bouquin, *et al*., (2010) bakteri akan berkurang secara signifikan ketika air minum ditambahkan asam organik. Heyndrickx, *et al.*, (2002) mengidentifikasi hubungan yang signifikan antara kedua variabel dan tingkat kontaminasi pada ternak. Asam organik digunakan sebagai antimikroba yang biasanya ditambahkan pada pakan atau air minum. Pemberian asam organik pada air memiliki efek ganda. Kerjanya secara langsung adalah mengurangi kuman patogen di dalam air dan secara tidak langsung pada sistem pencernaan unggas. Pengasaman air minum dapat menurunkan pH pencernaan yang berpengaruh terdahap perkembang biakan *Salmonella spp.* dan bahkan kelangsungan hidupnya (Byrd, *et al*., 2001; Jarquin *et al*., 2007). Air minum di tempat minum juga dapat terkontaminasi dari feses dan tempat minum yang tidak didesinfeksi secara teratur.

Cemaran *Salmonella spp.* pada pakan dapat disebabkan oleh komposisi pakan yang digunakan, penerapan higiene dan sanitasi pada tempat penyimpanan pakan dan penerapan kebersihan (desinfeksi). Pakan yang digunakan pada kedua peternakan ini adalah pakan organik, dimana komposisi paling banyak dalam pakan tersebut adalah tepung jagung. Hasil penelitian Petkar *et al.*, (2011), proporsi sampel positif untuk *Salmonella spp.* secara signifikan lebih tinggi pada pakan konvensional daripada pakan organik. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh tidak adanya komposisi protein hewani dan tidak adanya antimikroba alami pada pakan tersebut. Penyimpanan pakan pada kedua peternakan ini dilakukan di gudang pakan. Peternak melakukan pembersihan terhadap lantai gudang, membersihkan dan membuang ceceran pakan agar tidak terkontaminasi mikroorganisme.

5.2 Isolasi dan Karakterisasi *Salmonella spp.*

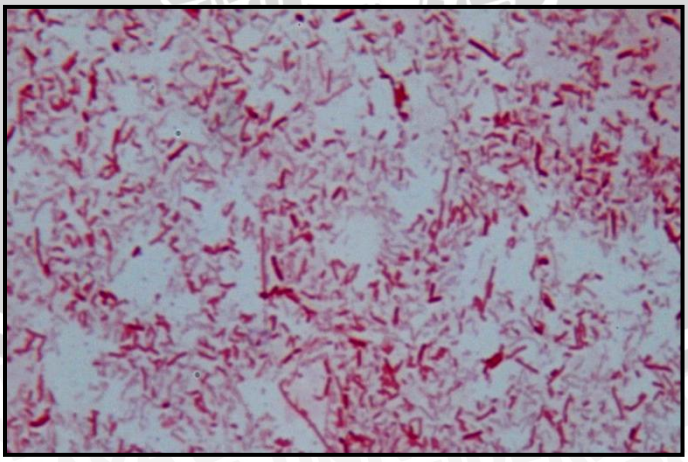
Isolasi dan karakterisasi bakteri untuk mengetahui isolat dugaan *Salmonella spp.*, menurut Adams *and* Moss., (2000) harus dikonfirmasi pada uji biokimia dan serologi. Uji biokimia ini yang meliputi uji katalase, uji oksidase, uji TSIA, uji urease, uji *Methyl Red*, uji *citrate*, uji sukrosa, laktosa, maltosa, dan manitol serta uji serologis *polyvalent* O.

Penelitian ini dilakukan tiga kali pengulangan dan diperoleh jumlah total koloni sebanyak 40 koloni, kemudian dari koloni tersebut dilakukan pengamatan morfologi koloni meliputi warna, bentuk, dan tepi. Dari pengamatan morfologi koloni, *Salmonella spp.* memiliki bentuk koloni irregular, rata dan flat. Hasil pengamatan profil koloni dapat dilihat pada Lampiran 6. Dalam media selektif

XLD, tampak koloni dugaan *Salmonella spp.* yang ditandai dengan adanya warna hitam ditengah koloni.

Selanjutnya 40 koloni (13 koloni dari feses di Mertojoyo, 13 koloni dari feses di Sawojajar, 8 koloni dari air minum di Mertojoyo, 6 koloni dari air minum di Sawojajar) tersebut dilakukan pengamatan morfologi bakteri dengan pewarnaan gram. Hasil dari 40 koloni menunjukkan morfologi bakteri *Salmonella spp.* dimana pewarnaan gram menunjukkan Gram negatif. *Salmonella spp.* dalam pewarnaan Gram ditandai dengan bentuk batang dan warna merah . Hal ini sesuai dengan White, *et al*., (2000) yang menyatakan bahwa *Salmonella spp.* merupakan bagian dari bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Dari 40 koloni tersebut tidak semua koloni dapat tumbuh. Hanya 9 koloni (7 koloni dari air minum di Mertojoyo, 2 koloni dari feses di Sawojajar) yang tumbuh dan kemudian dilakukan uji biokimia dan serologi. Hasil karakteristik morfologi isolat dugaan *Salmonella spp.* pada feses dan air minum dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Morfologi bakteri *Salmonella spp.* secara mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Gambar Morfologi Bakteri *Salmonella spp.* Perbesaran 100x

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan gram diperoleh 9 isolat dugaan *Salmonella spp.* (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Morfologi Isolat *Salmonella spp.*

No	Kode Isolat	Makroskopis				Mikroskopis		
		Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Bentuk	Gram	Warna
1.	**A13A1**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
2.	**A13B1**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
3.	**A13A2**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
4.	**A13B2**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
5.	**A15A**	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
6.	**F25A**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
7.	**F25B**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
8.	**A13A**	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah
9.	**A15B**	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	*Bacill*	-	Merah

Setelah dilakukan pewarnaan Gram selanjutnya 9 isolat dilakukan uji biokimia meliputi uji TSIA, urease, laktosa, sukrosa, manitol, maltosa, citrate, katalase, oksidase, MR dan uji serologis. Uji biokimia untuk menguatkan dugaan bahwa bakteri yang diisolasi merupakan bakteri *Salmonella spp.* Berdasarkan hasil uji biokimia dan serologi dari 9 isolat yang telah diisolasi hanya 5 isolat yang menunjukkan karakteristik bakteri *Salmonella spp.* (Tabel 5.3). Sesuai standar SNI 2897:2008, hasil uji biokimia menunjukkan bahwa *Salmonella spp.* bersifat fakultatif anaerob, Gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, tidak mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa, terjadi reaksi fermentasi terhadap manitol dan maltosa positif, uji *simmon citrate* positif, tidak dapat menghidrolisis enzim urea. *Salmonella spp.* juga memiliki kemampuan dapat mengaglutinasi dengan *Salmonella spp.* antibodi.

Pada Tabel 5.3 uji *Methyl Red* menunjukkan hasil yang bervariasi pada beberapa isolat. Hal ini dapat terjadi karena *Salmonella spp.* dapat tumbuh pada pH antara 4.4-9.4 (Brands, 2005; Bhunia, 2008). Pertumbuhan optimal *Salmonella spp.* dapat terjadi pada pH mendekati netral (D'aoust, 2001; Brands, 2005; Bhunia, 2008). Di bawah ini merupakan hasil pengamatan uji biokimia pada masing-masing isolat (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Hasil Uji Biokimia dan Uji Serologis *Salmonella spp.* pada Feses dan Air minum Berdasarkan SNI 2897:2008

Uji Biokimia	Isolat								
	A13A1	A13B1	A13A2	A13B2	A15A	F25A	F25B	A13A	A15B
TSIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Laktosa	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Sukrosa	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Uji Serologis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Salmonella spp.	-	-	*Salmonella spp.*	*Salmonella spp.*	*Salmonella spp.*	*Salmonella spp.*	-	-

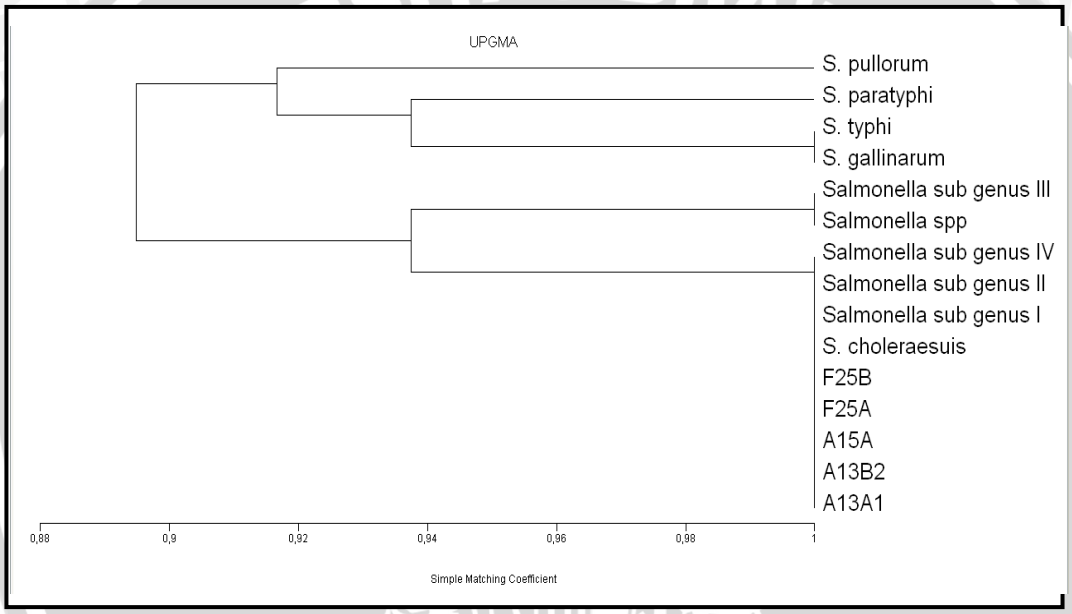
Keterangan : Tanda (+) : reaksi positif *Salmonella spp.*
Tanda (-) : reaksi negatif *Salmonella spp.*

Berdasarkan hasil uji biokimia terdapat 5 isolat yaitu A13A1, A13B2, A15A, F25A, F25B yang memenuhi karakteristik dari *Salmonella spp.*. *Salmonella spp.* pada media *citrate*, TSIA dan MR menunjukkan reaksi positif. Pada uji urease dan uji oksidase, *Salmonella spp.* menunjukkan reaksi negatif dengan tidak ada perubahan warna media (Mirmomeni, 2009). Menurut Adams

and Moss (2000), *Salmonella spp.* memiliki kemampuan dapat memfermentasi glukosa, maltosa dan dulcitol.

Data hasil karakterisasi biokimia isolat *Salmonella spp.* selanjutnya dianalisis menggunakan metode UPGMA untuk mengetahui similaritas dengan isolat acuan yang disajikan dalam bentuk fenogram. Hasil uji similaritas dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Gambar 5.2 Uji Similaritas Dengan Menggunakan Fenogram dugaan *Salmonella spp.*



Berdasarkan hasil uji similaritas dengan metode UPGMA, 5 isolat *Salmonella spp.* diketahui bahwa kelima isolat *Salmonella spp.* dapat diduga termasuk dalam kelompok *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella sub genus* I (*S. kauffmannii; S. enterica; S. enteritidis; S. typhimurium*), *Salmonella sub genus* II (*S.salamae; S.dar-es-salaam*), *Salmonella sub genus* IV (*S. houtenae*). Pengelompokan isolat *Salmonella spp.* berdasarkan nilai uji similaritas dengan isolat acuan seperti tampak pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Pengelompokan dugaan isolat *Salmonella spp.* hasil karakterisasi berdasarkan nilai uji similaritas dengan isolat acuan *Salmonella spp.*.

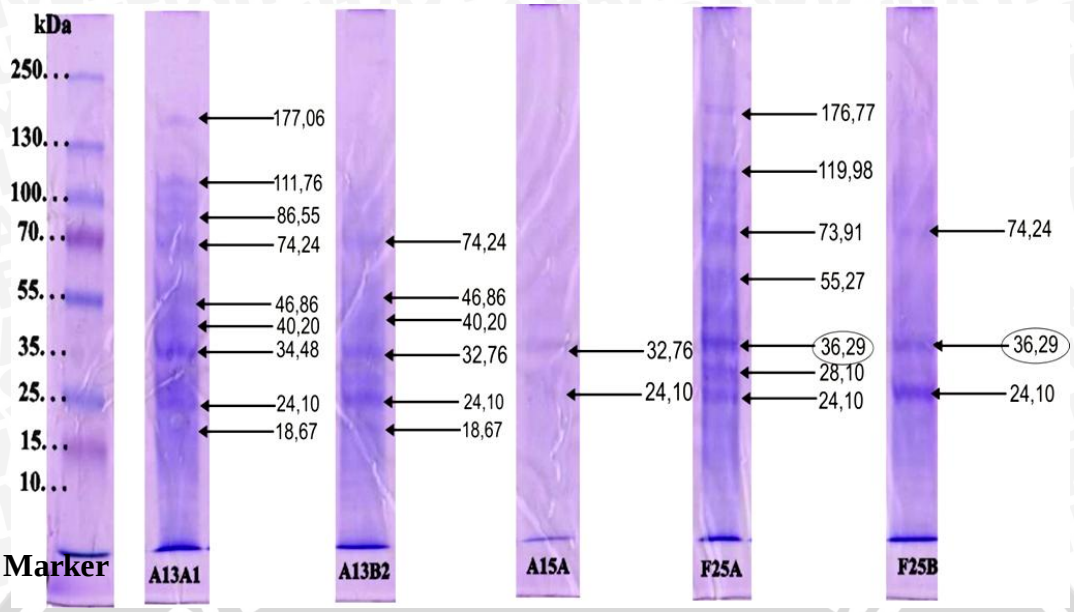
Kode Isolat	Sumber Isolat	Nilai Similaritas	Dugaan Isolat
F25B	Feses 2	1,000	*Salmonella spp.* spp. (sub genus I, sub genus II, sub genus IV, *Salmonella spp. choleraesuis*)
F25A	Feses 2	1,000	
A15A	Air minum 1	1,000	
A13B2	Air minum 1	1,000	
A13A1	Air minum 1	1,000	

.

5.3 Analisa Profil Pita Protein *Salmonella spp.*

Hasil analisa profil pita protein isolat akan mendukung hasil karakterisasi secara morfologi dan biokimia isolat *Salmonella spp.* serta pendugaan isolat dengan uji similaritas. Hasil karakterisasi profil pita protein isolat *Salmonella spp.* yang diisolasi dari feses ayam dan air minum dapat dilihat pada Gambar 5.3.

Hasil analisis protein pada gel elektroforesis dapat terlihat berat molekul dan jumlah pita protein isolat *Salmonella spp.* Data perhitungan berat molekul pita protein dapat dilihat pada (Lampiran 8). *Running* dengan elektroforesis menggunakan acuan protein marker *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder Plus* dengan berat molekul 10 hingga 250 kDa dapat terdeteksi berat molekul isolat *Salmonella spp.* dengan kisaran 18,67 hingga 177,06, profil protein *Salmonella spp.* dapat dilihat pada Tabel 5.5.



Gambar 5.3 Profil pita protein *Salmonella spp.* hasil SDS-PAGE

Tabel 5.5 Profil Protein *Salmonella spp.* berdasarkan Berat Molekul Protein Hasil SDS PAGE dengan satuan (kDa)

Marker	A13A1	A13B2	A15A	F25A	F25B
130	177,06	-	-	-	-
130	-	-	-	176,77	-
100	-	-	-	119,98	-
100	111,76	-	-	-	-
70	86,55	-	-	-	-
70	74,24	74,24	-	-	74,24
70	-	-	-	73,91	-
55	-	-	-	55,27	-
35	46,86	46,86	-	-	-
35	40,20	40,20	-	-	-
35			36,29	36,29	36,29
35	34,48	-	-	-	-
35	-	32,76	32,76	-	-
25	24,10	24,10	24,10	24,10	24,10
15	18,67	18,67	-	-	-

Keterangan : Tanda (-) menunjukkan pita protein dengan berat molekul tersebut tidak terdeteksi.

Pita protein yang terdeteksi berkaitan dengan karakteristik dari isolat *Salmonella spp.* hasil isolasi. Variasi profil pita protein dari masing-masing isolat menggambarkan keragaman dari isolat *Salmonella spp.* Kemiripan profil pita

protein yang terdeteksi menunjukkan bahwa isolat *Salmonella spp.* mempunyai karakteristik yang sama. Semakin banyak kesamaan jumlah pita protein yang terdeteksi menunjukkan kesamaan karakteristik.

Isolat A13A1, A13B2 dan F25B memiliki karakteristik yang sama ditunjukkan dengan adanya profil pita protein dengan berat molekul 74,24 kDa yang dimiliki ketiga isolat tersebut, antara A13A1 dan A13B2 memiliki kemiripan karakteristik yang lebih tinggi dengan adanya 5 pita protein yang sama dengan berat molekul berturut-turut 74,24 kDa, 46,86 kDa, 40,20 kDa, 24,10 kDa, 18,67 kDa. Isolat A13B2 dan A15A memiliki karakteristik yang sama ditunjukkan dengan pita protein yang memiliki berat molekul 32,76 kDa yang dimiliki kedua isolat tersebut. Isolat F25A dan F25B memiliki karakteristik yang sama ditunjukkan dengan pita protein yang memiliki berat molekul 36,29 kDa yang dimiliki ketiga isolat tersebut. Isolat A13A1, A13B2, A15A, F25A, F25B memiliki karakteristik yang sama ditunjukkan dengan pita protein yang memiliki berat molekul 24,10 kDa yang dimiliki kelima isolat tersebut.

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE isolat F25A dan F25B mempunyai pita protein yang sama dengan berat molekul 36,29 kDa dan diduga dari profil protein tersebut merupakan pita protein yang dimiliki oleh *S. enteritidis* atau *S. typhimurium*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nakamura *et al.*, (2002) menunjukkan bahwa dari analisis SDS-PAGE menggambarkan seluruh pita protein *S. typhimurium* dan *S. enteritidis* memiliki kesamaan, dimana dalam penelitian tersebut *S. typhimurium* mempunyai protein dengan berat molekul 36,4 kDa, sedangkan *S. enteritidis* mempunyai protein dengan berat molekul 36,5 kDa. Hasil analisis ini mendukung hasil pengelompokan berdasarkan nilai similaritas

yang mengelompokkan isolat F25A dan F25B ke dalam kelompok *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella sub genus* I (*S. kauffmannii; S. enterica; S. enteritidis; S.typhimurium*), *Salmonella sub genus* II (*S.salamae; S.dar-es-salaam*), *Salmonella sub genus* IV (*S. houtenae*) dengan nilai similaritas 1,000.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas maka disimpulkan bahwa :

1. Terdapat cemaran *Salmonella spp.* pada feses di peternakan Sawojajar dan air minum di peternakan Mertojoyo dengan jumlah koloni yang bervariasi yang menunjukkan besarnya tingkat cemaran.
2. Terdapat variasi *Salmonella spp.* di peternakan ayam yang ditandai dengan hasil karakterisasi biokimia, serologi, dan profil pita protein. Berdasarkan hasil analisis profil pita protein, isolat F25A dan F25B mempunyai salah satu pita protein yang berat molekulnya 36,29 kDa dan diduga isolat tersebut merupakan jenis pita protein *S. enteritidis* atau *S. Typhimurium* dikarenakan isolat tersebut berat molekulnya mendekati berat molekul *S. typhimurium* yaitu 36,4 kDa dan *S. enteritidis* yaitu 36,5 kDa.

6.2 Saran

1. Perlu diadakan penelitian lanjutan untuk menganalisa secara genotype agar lebih diketahui secara pasti serotype-serotype *Salmonella spp.* yang sudah didapat.

2. Perlu adanya peningkatan biosekuriti pada program kebersihan lingkungan di sekitar lingkungan peternakan ayam secara teratur untuk mencegah atau mengurangi kontaminasi *Salmonella spp.* dan mencegah penularan ke manusia.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR PUSTAKA

Adams M.R., and M.O. Moss. 2000. *Food Microbiology Second Edition*. University of Surrey. Guildford. UK.

Aksakal, A. 2010. *Analysis of whole cell protein profiles of Salmonella serovars isolated from chicken, turkey and sheep faaeces by SDS-PAGE*. Faculty of Veterinary Science, Yucunzu Yil University, Van, Turkey.

Alisantosa, B., H. L. Shivaprasad, A. S. Dhillon, O. Schaberg, and D. Bandli. 2000. *Pathogenicity of Salmonella enteritidis phage types 4, 8 and 23 in specific pathogen free chicks*. Avian Path. 29: 583-592.

Andriani, M. Sudarwanto, dan D.W Lukman. 2003. *Dekontaminasi Salmonella sp Pada Karkas Ayam Menggunakan Asam Organik dan Klorin*. Laboratorium Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian: Bogor.

Angen, O., M. N. Skov, M. Chriel, J. F. Agger, and M. Bisgaard. 1996. *A retrospective study on Salmonella infection in Danish broiler flocks*. Preventive. Vet. Med. 26: 223-237.

Anonimous. 2008. SNI 2897-2008. *Metode Pengujian Cemaran Mikroba Dalam Daging, Telur Dan Susu, Serta Hasil Olahannya*. ICS 67.120.20.

Arzey, G. 2007. *Newcastle Disease-compulsory vaccination.* New South Wales : NSW Department of Primary Industries.

Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Penerbit Citra Mentari Group: Malang.

Bennasar, A., G. Luna, B. Cabrer, and J. Lalucat. 2000. *Rapid identification of Salmonella typhimurium, S. enteritidis and S. virchow isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods*. Int. Microbia. 3: 31-38.

Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella nomenclature*. J. Clin. Microbiol. 38: 2465–2467.

Bhunia, A. K. 2008. *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*. United States of America: Springer Science + Business Media, LLC.

Bouquin, S. L., V. Allain, S. Rouxel, I. Petetin, M. Picherot, V. Michel, and M. Chemaly. 2010. *Prevalence and risk factors for Salmonella spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period*. Prev. Vet. Med. 97: 245–251.

Brands, D. A. 2006. *Deadly Diseases and Epidemics: Salmonella*. Philadelphia: Chelsea House Pub.

Budinuryanto, D. C., M. H. Hadiana, R. L. Balia, Abubakar, dan E. Widosari. 2000. *Profil keamanan daging ayam lokal yang dipotong di pasar tradisional dalam kaitannya dengan penerapan sistem Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)*. Laporan Hasil Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran dan Proyek ARMP II Badan Litbang Pertanian.

Burtscher, C., P. A. Fall, P. A. Wilderer, and S. Wuertz, 1999. *Detection of Salmonella spp and Listeria monocytogenes in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR*. Appl. Env. Microbiol. 26: 2235-2237.

Byrd, J. A., B. M. Hargis, D. Caldwell, R. H. Bailey, K. L. Herron, , J. L. Mc Reynold, R. L. Brewer, R. C. Anderson, K. M. Bischoff, T. R. Callaway, and L. F. Kubena. 2001. *Effect of acid lactic administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on Salmonella and Campylobacter contamination of broilers*. Poult. Sci. 80: 278–283.

Carli, K. T., C. B. Unal, V. Caner, and A. Eyigor. 2001. *Detection of Salmonella in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis*. J. Clin. Microbiol. 39: 1871-1876.

Carrique-Mas, J. J., M. Breslin, L. Snow, I. Mc Laren, A. R. Sayers, and R. H. Davies. 2009. *Persistence and clearance of different Salmonella serovars in Building housing laying hens*. Epidemiol. Infect. 137: 837-846.

Chiu, C. H., and T. O. Jonathan. 1996. *Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay*. J. Clin. Microbiol. 67: 2619-2622.

Davies, R. H., R. A. J. Nicholas, I. M. Mc Laren, J. D. Corkish, D. G. Lanning, and C. Wray. 1997. *Bacteriological and serological investigation of persistent Salmonella enteriditis infection i nan integrated poultry organisation*. Vet. Microbiol. 58: 277-293.

Ferretti, R., L. Mannazzu, L. Cocolin, G. Comi, and F. Clementi. 2001. *Twelve-hours PCR-based method for detection of Salmonella spp*. In food. Appl. Environ. Microbiol. 74: 977-978.

Ferreira, A. J. P., C. S. A. Ferreira, T. Knobl, A. M. Moreno, M. R. Bacarro, M. Chen, M. Robach, and G. C. Mead. 2003. *Comparison of Three Commercial Competitive-Exclusion Products for Controlling Salmonella Colonization of Broilers in Brazil*. J. Food Prot. 66: 409-492.

Gast, R. K. 1997. *Paratyphoid infections. In Disease of Poultry. Tenth Edition. (Eds: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. MC.Douglad, and Y.M. Saif*). Iowa State university Press, ames, Iowa, USA. pp. 97- 112.

Gustiani, E. 2009. *Pengendalian Cemaran Mikroba Pada Bahan Pangan Asal Ternak (Daging dan Susu) Mulai Dari Peternakan Sampai Dihidangkan*. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Barat.

Haraa-kudo, Y., Y. Sakakibara, H. Konuma, T. Sawada, dan S. Kumagai. 2001. *Laying season and egg shell cracks on growth of Salmonella enteritidis in the egg albumen during storage*. J. of Food Protect. 4 (8): 1134-1137.

Heyndrickx, M., D. Vandekerchove, L. Herman, I. Rollier, K. Grijspeerdt, and L. De Zutter. 2002. *Routes for Salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse*. Epidemiol. Infect. 129: 253–265.

Humphrey, T. J. 2006. *Growth of Salmonella in intact shell eggs: Influence of storage temperature*. Vet. Rec. 126: 292.

Jarquin, R. L., G. M. Nava, A. D. Wolfenden, A. M. Donoghue, I. Hanning, S. E. Higgins. and B. M. Hargis. 2007. *The Evaluation of Organic Acids and Probiotic Cultures to Reduce Salmonella enteriditis Horizontal Transmission and Crop Infection in Broiler Chickens*. Int. J. Poult. Sci. 6: 182-186.

Jawetz, Melnick, and Adelbeg's. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran. Ed: 23*. EGC: Jakarta.

Jay, J. M., M. J. Loessner, and D. A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology 7th edition*. Springer Science + Business Media. New York, NY.

Jefrey, J.S. 2006. Biosecurity rules for poultry flocks. *World Poultry* 13(9): 101

Lehninger, A. L. 2004. *Biocehmistry. Ed ke-4*. Worth Publishers, Inc: USA.

Lodish, H. D., A. Baltimore, S. C. Berk, P. Zipusky, Matsudaria, and Darnel. 2001. *Mollecular Cell Biology 3rd* . Scientific American Book: New York.

Mallinson, E. T., C. E. de Rezende, N. L. Tablante, L. E. Carr, and S. W. Joseph. 2000. *A Management technique to identify prime locations of Salmonella contamination on broiler and layer farms*. J. Appl. Poult. Res. 9: 364-370.

Mirmomeni, M. H., S. Naderi, H. A. Colagar, and S. Sisakhtnezhad. 2009. *Isolation of Salmonella enteritidis using biochemical tests and diagnostik potential of SdfI amplified gene*. Res. J Biol. Sci. 4 (6): 656-661.

Myint, M. S. 2004. *Epidemiology of Salmonella Contamination of Poultry meat Products: Knowledge GAPS in the Farm to Store Product*. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

Nakamura, A., Y. Ota, A. Mizukami, T. Ito, Y. B. Ngwai, and Y. Adachi. 2002. *Evaluation of aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after effect on the antibody response of chickes of Sallmonella*. Poult. Sci. 81: 1653–1660.

Namata, H., M. Aerts, C. Faes, and K. Mintiens. 2006. *Risk factor identification of Salmonella for layer chickens in Belgium*. In: Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiologogy and Economics.

Payne, J. B., E. C. Kroger, and S. E. Watkins. 2002. *Evaluation of litter treatments on Salmonella recovery from poultry litter*. J. Appl. Poult. Res. 11(3): 239- 243.

Petkar, A., W. Q. Alali, M. A. Harrison, and L. R. Beuchat. 2011. *Survival of Salmonella in Organic and Conventional Broiler Feed as Affected by Temperature and Water Activity*. Agriculture Food and Analytical Bacteriology (www.afab.journal)

Primajati, Satwika Esa. 2011. Deteksi Bakteri Patogen *Salmonella spp* dan *Listeria Monocytogenes* pada Karkas Ayam Broiler Segar yang Beredar di Kota Malang. (abstrak) Universitas Brawijaya Malang

Saadah, V.S., Lestari, A. Natsir dan H.M. Ali. 2010. *Penerapan Biosekuriti Untuk Kegiatan Usaha Peternakan Unggas Non Industri Komersial Di Sulawesi Selatan*. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanuddin. Makassar

Shulaw, W.P., G.L Bowman. 2001. *On-farm biosecurity: Traffic control and sanitation*. http://www.ohioline.osu.edu [13 Februari 2013].

Stanton, N. 2004. Biosecurity trifold. *Maryland Department of Agriculture News* 1(1). http://www.aphis.usda.gov/vs.html. [13 Februari 2013].

Suwandono, A. M., Destri, dan C. Simanjuntak. 2005. *Salmonellosis dan Surveillans demam tifoid yang disebabkan Salmonella di Jakarta Utara*. Disampaikan dalam Lokakarya Jejaring Intelijen Pangan – BPOM RI, Jakarta, 25 Januari 2005.

Svendsen, L., D. O'Brien, G. Stolduski, and J. Hau.1994. *Use of chicken and exploitation of egg yolk antibody production*. Royal Society of Medicine Press London, pp: 324-327.

Thiagarajan, D., A. M. Saeed, and E. K. Asem. 1994. *Mechanism of transovarian transmission of Salmonella enteritidis in laying hens*. Poul. Sci. 73: 89-98.

Todar , K. 2008. *Salmonella and Salmonellosis*. http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html (diakses pada tanggal 9 Maret 2012).

Wales, A., M. Breslin, and R. Davies. 2006. *Semiquantitative assessment of the distribution of Salmonella in the Environment of Cage layer flocks*. J. Apll. Microbiol. 101: 309-318.

Walker, J. M. 2009. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Di dalam: Walker JM, editor. The Protein Protocols Handbook. Ed ke-3*. UK: Human Press. hlm 177-186.

Wang, H., and M. F. Slavik. 1998. *Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times*. J. of Food Protect. 61(3): 276- 279.

Weeks, C. G., H. J. Hutcheson, L. M. Kim, D. Bolte, J. Traub-Dargatz, P. Morley, B. Powers, and M. Jenssen. 2002. *Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of Salmonella spp*. J. Clin. Microbiol. 36: 1487-1492.

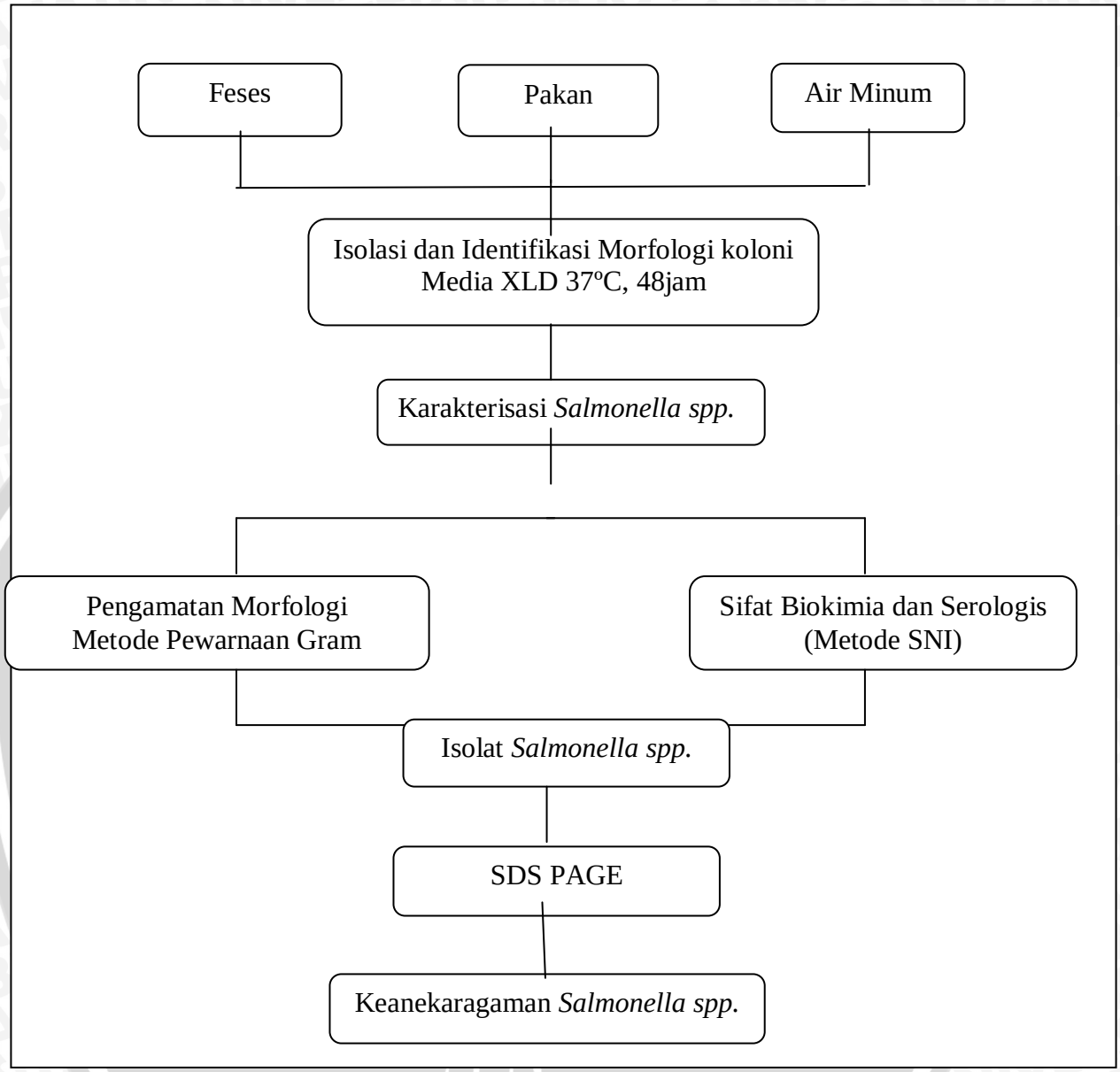
White, D. G., S. Zhao, R. Sudler, S. Ayers, S. Friedman, S. Chen, P. F. McDermott, S. McDermott, D. D. Wagner, and J. Meng. 2001. *Salmonella from retail ground meats*. Engl. J. Med. 345: 1147–1154.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN 1



Gambar 1. Skema Kerja Penelitian

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN 2

Langkah kerja penelitian :

1. Pra pengayaan (*pre enrichment*)

- Sampel feses dan sampel pakan ditimbang sebanyak 10 gram, sedangkan sampel air minum diukur sebanyak 10 ml kemudian dimasukkan dalam wadah steril.
- Sebanyak 90 ml larutan *Peptone Water* (PW) dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi sampel, kemudian divortex selama 1 menit sampai dengan 2 menit agar homogen.
- Diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 24 jam. Setelah diinkubasi, sampel yang sudah terlarut pada *Peptone Water* diambil sebanyak 1 ml dengan mikropipet dan dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml *Peptone Water* sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Dari pengenceran 10^{-2} tersebut dibuat pengenceran bertingkat sampai pengenceran 10^{-7} (Anonimous, 2008).

2.Pengayaaan (enrichment)

- Sampel pada pra pengayaan diambil dari pengenceran 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} divortex selama 1 menit, kemudian diambil dan pindahkan masing-masing 1 ml ke dalam media 10 ml *Selenite Cystine Broth* (SCB) dan divortex.
- Sampel diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 24 jam. Adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan kekeruhan warna media (Anonimous, 2008).

3. Isolasi bakteri

- Dari sampel pengayaan pada pengenceran 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} diambil 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri.
- Kemudian *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) Agar dituangkan sebanyak 15 ml pada cawan petri tersebut. Setelah tercampur, cawan petri dihomogenkan dan dibiarkan memadat.
- Setelah itu diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 48 jam (Anonimous, 2008).

4. Pemurnian bakteri

- Dua atau lebih koloni diambil dengan jarum *ose* dari media *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) agar yang telah diinkubasi, dan di inokulasi pada media *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) agar.
- Setelah itu diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 24 jam. Setelah 24 jam, koloni bakteri diamati. Jika belum didapat biakan murni, dilakukan pemurnian kembali (Anonimous, 2008).

5. Penyimpanan isolat bakteri

- Koloni tunggal diambil dengan jarum ose dari media *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD) agar, kemudian di inokulasi pada agar miring *Nutrient Agar* (NA) dengan cara ditusuk ke dasar media agar dan digores.
- Setelah itu diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 24 jam. Setelah diinkubasi, isolat dapat disimpan pada suhu -20 ºC (Anonimous, 2008).

6. Pewarnaan Gram

1) Persiapan sampel/pembuatan preparat

- Obyek glass dibersihkan dengan tisu yang dibasahi alkohol.
- Aquades diteteskan sedikit dan diletakkan diatas obyek glass kemudian difiksasi.
- Satu ose koloni diambil dari biakan padat dengan menggunakan kawat ose dan dicampur dengan aquades yang ada di obyek glass kemudian ratakan hingga menghasilkan ulasan yang sangat tipis.
- Difiksasi diatas api untuk melekatkan bakteri pada obyek glass.

2) Pewarnaan gram

- Preparat ulas yang sudah dibuat ditetesi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Cuci dengan aquades dan kemudian fiksasi.
- Larutan *Iodine* atau lugol diteteskan dan biarkan selama 1 menit. Dicuci dengan aquades dan difiksasi.
- Larutan aceton alcohol diteteskan dan dibiarkan selama 30 detik. Dicuci dengan aquades dan difiksasi.
- Larutan safranin diteteskan dan biarkan selama 1 menit. Dicuci dengan aquades dan difiksasi.

3) Pengamatan

- Preparat diamati dibawah mikroskop: jenis gram dan bentuknya. Penggunaan mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan menambahkan minyak emersi diatas preparat yang telah dibuat.
- Gambar dari tiap sampel diamati menggunakan mikroskop dan diambil menggunakan foto digital.

7. Uji Biokimia *Salmonella spp.* (metode SNI 2897:2008)

1) Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

- Identifikasi dilakukan dengan mengambil koloni yang diduga dari media tersebut, dan diinokulasikan ke *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan cara ditusuk ke dasar media agar, selanjutnya pada media agar miring.
- Diinkubasikan pada temperatur 37º C selama 24 jam. Tabung ditutup secara longgar untuk memelihara kondisi aerobik pada waktu inkubasi agar miring dan mencegah produksi H_2S berlebih. (Anonimous, 2008).

2) Uji *Urease*

- Koloni diinokulasi dari positif TSIA dengan *ose* ke urea broth.
- Diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 24 jam. Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negatif (Anonimous, 2008).

3) Uji *Methyl Red (MR)*

- Biakan dari media TSIA diambil dengan *ose* dan diinokulasi ke dalam tabung yang berisi 10 ml media MR
- Diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 48 jam. Ditambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator *methyl red* pada tabung. (Anonimous, 2008).

4) Uji *Citrate*

- Koloni dari TSIA diinokulasi ke dalam *Simmon Citrate Agar* (SCA) dengan cara ditusuk dan digores menggunakan *ose*.

- Diinkubasi pada temperatur 37º C selama 96 jam. Hasil uji positif ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni yang diikuti perubahn warna dari hijau menjadi biru. Hasil uji negatif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni atau tumbuh sangat sedikit dan tidak terjadi perubahan warna. Umumnya *Salmonella* spp memberikan hasil positif pada uji citrate (Anonimous, 2008).

5) Uji *Phenol Red Lactose Broth*

- Koloni dari TSIA miring diinokulasi ke dalam *phenol red lactose broth*.
- Diinkubasi pada temperatur 37 ºC dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam. Hasil reaksi positif ditandai dengan produksi asam (warna kuning) dengan atau tanpa gas. *Salmonella spp* memberikan hasil reaksi negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna dan pembentukan gas (Anonimous, 2008).

6) Uji *Phenol Red Sucrose Broth*

- Koloni dari TSIA miring diinokulasi ke dalam *phenol red sucrose broth*.
- Diinkubasikan pada temperatur 37 ºC selama 48 jam dan diamati selama 24 jam. Hasil uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna kuning dan dengan atau tanpa perubahan warna kuning dan pembentukan gas (Anonimous, 2008).

7) Uji *Phenol Red Maltose Broth*

- Koloni dari TSIA miring diinokulasi ke dalam *phenol red maltose broth*.

- Diinkubasikan pada temperatur 37 ºC selama 48 jam.
- Hasil interpretasi *Salmonella spp* ditandai hasil reaksi positif yaitu dengan ada perubahan warna dan pembentukan gas.

8) Uji *Phenol Red Manitol Broth*

- Koloni dari TSIA miring diinokulasikan ke dalam *phenol red manitol broth*.
- Diinkubasikan pada temperatur 37 ºC selama 48 jam dan diamati selama 24 jam.
- Hasil interpretasi *Salmonella spp* ditandai hasil reaksi positif yaitu dengan ada perubahan warna dan pembentukan gas.

9) Uji *Katalase*

- Isolat dari kultur bakteri diambil satu *ose*, kemudian dioleskan pada *object glass* yang telah diberi alkohol. *Object glass* ditetesi dengan larutan H_2O_2 3% 2-3 tetes
- Preparat diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat. Jika terjadi reduksi H_2O_2 akan terlihat adanya gelembung O_2 di sekeliling pertumbuhan bakteri.

10) Uji Oksidase

- Obyek glass dibersihkan dengan tisu yang dibasahi alkohol.
- Dipersiapkan kit oksidase.
- Satu ose kultur bakteri diambil menggunakan tusuk gigi dan digoreskan pada kit oksidase yang ada di obyek glass.
- Preparat positif *Salmonella spp.* ditunjukkan adanya oksidase negatif yaitu tidak ada perubahan warna pada oksidase kit.

11) Uji *polyvalent somatic O*

- Obyek glass dibersihkan menggunakan alkohol.
- Satu ose koloni dari TSIA diletakkan pada obyek Glass dan ditambahkan satu tetes larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) steril dan diratakan dengan kultur kemudian ditetesi *Salmonella polyvalent somatic O* antiserum di samping suspensi koloni.
- Suspensi koloni dilarutkan ke antiserum sampai tercampur sempurna dan dimiringkan ke kiri dan ke kanan dengan latar belakang gelap.
- Preparat positif *Salmonella spp.* ditunjukkan dengan adanya reaksi aglutinasi.

7) Analisa profil pita protein *Salmonella spp.* menggunakan SDS-PAGE

1) Preparasi Sampel Protein

- Menggunakan isolat *Salmonella* yang telah ditumbuhakan pada *NA broth*.
- Sampel bakteri dimasukan ke tabung *Polypropilen* sebanyak 1 ml dan disuspensikan ke dalam 5 ml nphosphate buffer saline (PBS) pH 7,4 serta disonifikasi selama 10 menit kemudian disentrifugasi 6.000 rpm selama 15 menit.
- Pelet yang terbentuk ditambahkan ethanol (EtOH) 96% dengan perbandingan 1:1 dan disimpan dalam freezer dalam suhu -20 ^{o}C selama 24 jam.

- Isolat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang dan pelet dikeringkan di udara bebas .
- Pelet ditambahkan buffer Tris-HCl dingin 20 mM dengan perbandingan 1:1. Isolat protein *Salmonella spp* disimpan pada suhu -80 ^{o}C .

2) Persiapan gel

- Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).
- Larutan *separating gel* 12% dimasukkan hati-hati ke dalam plate elektroforesis menggunakan mikropipet dan dibiarkan hingga memadat.
- Larutan *stacking gel* 4% dituang di atas separating gel yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk sumuran sampel dan dibiarkan hingga memadat.
- Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. Selanjutnya plate dipasang pada alat elektroforesis, berikutnya buffer dituangkan pada bejana elektroforesis.

3) Injeksi sampel.

- Sebanyak 15 μL sampel isolat protein ditambah 15 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*), dan dimasukkan ke dalam mikrotube, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 ^{o}C selama 5

menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam setiap sumur gel dengan volume 15 μL. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 28 mA dan 200 V. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

4) Pewarnaan dan pencucian gel.

- Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 45 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis discan.

5) Penentuan berat molekul.

Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai

- Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

$$\mathbf{Rf} = \frac{\text{migrasi dari sisir sampai pita yang bersangkutan}}{\text{migrasi dari sisir sampai bawah}}$$

- Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y . Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

LAMPIRAN 3

Pembuatan Reagen dan Media Penelitian

1. *Urea Broth*

Bahan-bahan:

a. Urea 1 gram

b. Yeast Ekstrak 0,005 gram

c. Na_2HPO_4 0,005 gram

d. Phenol Red 1,6% 0,5ml

e. Akudes steril 50 ml

Cara membuat:

Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam wadah yang telah disterilkan terlebih dahulu dan dicampur akuades serta dilarutkan menggunakan pengaduk kaca steril. Setelah larut, *urea broth* disaring menggunakan *millifilter membrane* steril dan dituang sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi steril.

2. *Methyl Red*

Bahan-bahan:

a. *Methyl Red* 0,005 gram

b. Akudes steril 20 ml

Cara membuat:

Methyl red dicampur di dalam akuades steril dan dilarutkan menggunakan *magnetic stirer* sampai semua terlarut.

3. *Phenol Red Lactose Broth*

Bahan-bahan:

a. *Beef ekstrak* 0,15 gram

b. *Peptone* 0,25 gram

c. *Lactose* 0,25 gram

d. *Phenol red* 0,05 ml

e. Akuades 50 ml

Cara membuat:

Semua bahan kecuali *phenol red* dilarutkan di dalam akuades dengan sedikit pemanasan. Setelah larut, ditambah *phenol red* dan diukur PH ± 7. Larutan dipindahkan sebanyak 5 ml ke tabung reaksi dan dimasukkan tabung Durham pada posisi terbalik serta tidak ada gelembung gas di dalamnya. Setelah itu, larutan disterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit.

4. *Phenol Red Sucrose Broth*

Bahan-bahan:

a. *Beef ekstrak* 0,15 gram

b. *Peptone* 0,25 gram

c. *Sucrose* 0,25 gram

d. *Phenol red* 0,05 ml

e. Akuades 50 ml

Cara membuat:

Semua bahan kecuali *phenol red* dilarutkan di dalam akuades dengan sedikit pemanasan. Setelah larut, ditambah *phenol red* dan diukur PH ± 7. Larutan dipindahkan sebanyak 5 ml ke tabung reaksi dan dimasukkan tabung Durham pada posisi terbalik serta tidak ada gelembung gas di dalamnya. Setelah itu, larutan disterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit.

5. *Phenol Red Maltose Broth*

Bahan-bahan:

a. *Beef ekstrak* 0,15 gram

b. *Peptone* 0,25 gram

c. *Maltose* 0,25 gram

d. *Phenol red* 0,05 ml

e. Akuades 50 ml

Cara membuat:

Semua bahan kecuali *phenol red* dilarutkan di dalam akuades dengan sedikit pemanasan. Setelah larut, ditambah *phenol red* dan diukur PH ± 7. Larutan dipindahkan sebanyak 5 ml ke tabung reaksi dan dimasukkan tabung Durham pada posisi terbalik serta tidak ada gelembung gas di dalamnya. Setelah itu, larutan disterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit.

6. *Phenol Red Manitol Broth*

Bahan-bahan:

a. *Beef ekstrak* 0,15 gram

b. *Peptone* 0,25 gram

c. *Manitol* 0,25 gram

d. *Phenol red* 0,05 ml

e. Akuades 50 ml

Cara membuat:

Semua bahan kecuali *phenol red* dilarutkan di dalam akuades dengan sedikit pemanasan. Setelah larut, ditambah *phenol red* dan diukur PH ± 7. Larutan dipindahkan sebanyak 5 ml ke tabung reaksi dan dimasukkan tabung Durham pada posisi terbalik serta tidak ada gelembung gas di dalamnya. Setelah itu, larutan disterilisasi pada suhu 121ºC selama 15 menit.

7. Pembuatan *separating* gel

Persentase akhir akrilamit yang digunakan adalah 12%. Campuran larutan (8 ml, untuk 1 *plate*) yang digunakan sebagai berikut :

a. 40% akrilamid/1.1 bisakrilamid 2.40 ml

b. 4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8 2.00 ml

c. Aqudes 3.49 ml

d. 10% APS 0.10 ml

e. TEMED 0.01 ml

Cara pembuatan :

Plat elektroforesis disusun mengikuti petunjuk pembuatannya. larutan akrilamid, buffer 4X Tris-CL/SDS pH8,8 dan akuades dicampur dalam erlenmeyer menggunakan *stirrer*. Ammonium persulfat dan TEMED

kemudian ditambahkan pada campuran tersebut. Campuran/larutan di atas dituangkan dengan pipet ke dalam susunan kaca elektroforesis melalui kaca pemisah untuk mengurangi kemungkinan timbulnya gelembung udara. Dilakukan dengan cepat dan hati-hati, 0,5-1 cm bagian yang tidak diisi.

8. Pembuatan *stacking* gel

Persentase akhir akrilamit yang digunakan adalah 4%. Campuran larutan yang digunakan (8 ml untuk satu plat) sebagai berikut :

a. 40% akrilamit/1,1 bisakrilamit 0.300 ml

b. 4X Tris-Cl/SDS pH 6,8 0,750 ml

c. Akuades 1,895 ml

d. APS 0,050 ml

e. TEMED 0,005 ml

Cara pembuatan :

Akuades di atas separating gel dihilangkan dengan tisu. Larutan akrilamid dan buffer 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8 dicampurkan dalam erlenmeyer dan stirer. Ammonium persulfat dan TEMED kemudian ditambahkan pada campuran di atas. Larutan gel tersebut dituangkan menggunakan pipet di atas separating gel sampai memenuhi bagian atas kaca elektroforesis. Sisir dimasukkan dengan hati-hati, dipastikan tidak terbentuk gelembung udara yang terperangkap pada ujung gigi. Setelah terjadi polimerisasi membentuk gel (± 30 menit), gel ditempatkan dalam *chamber* elektroforesis.

9. Larutan *staining*

Gel ditempatkan dalam wadah yang berisikan larutan *Coomassie Brilliant Blue* selama ± 30 menit.

10. Larutan *destaining*

Larutan staining dihilangkan dengan campuran metanol, asam asetat glasial dan akuades dengan perbandingan 2:1:7 selama ± 24 jam.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN 4

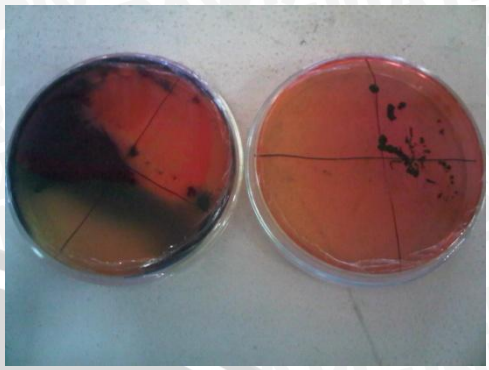
Dokumentasi Penelitian

Gambar 4.1 Kondisi Peternakan Ayam Mertojoyo

Gambar 4.2 Kondisi Peternakan Ayam Sawojajar

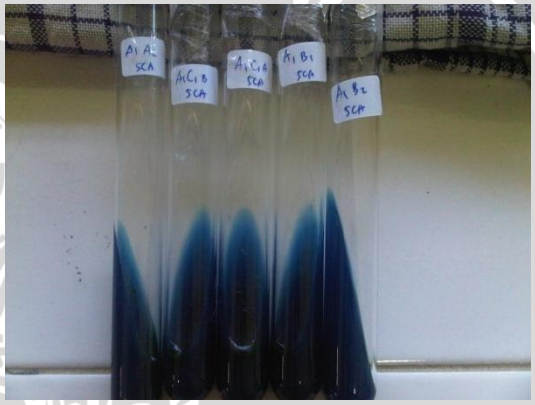
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Gambar 4.3 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Media SCB

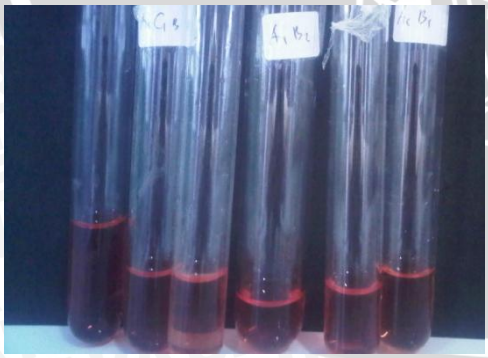


Gambar 4.4 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Media XLD

Gambar 4.5 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Media TSIA



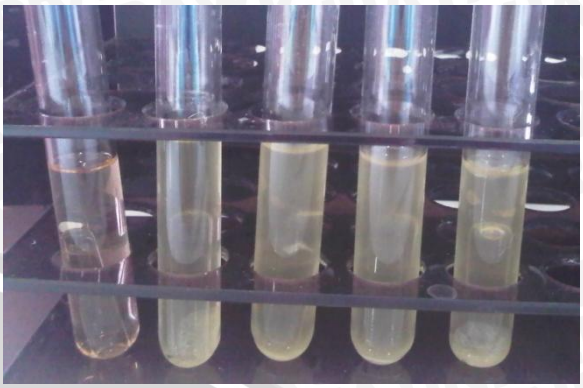
Gambar 4.6 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Media SCA



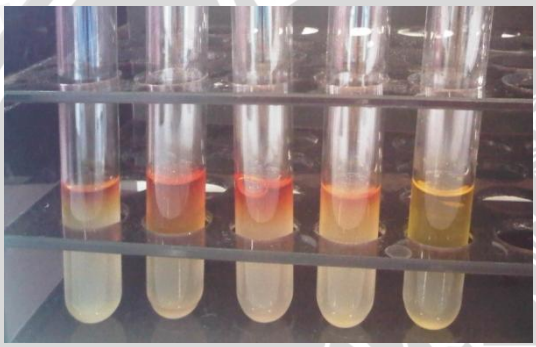
Gambar 4.7 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Uji Urease

Gambar 4.8 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Uji Laktosa

Gambar 4.9 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Uji Sukrosa



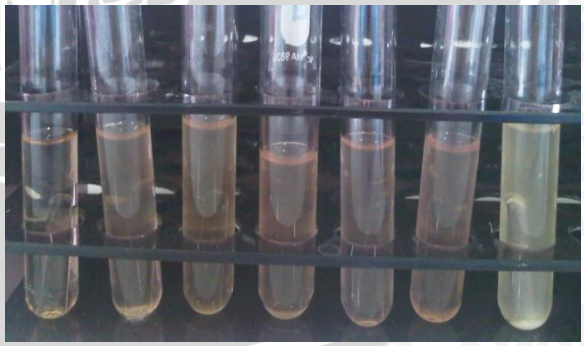
Gambar 4.13 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Uji Maltosa



Gambar 4.11 Hasil Positif *Salmonella* pada Uji MR

Gambar 4.10 Hasil Postif *Salmonella* pada Uji *Polyvalent Somatic O*

Gambar 4.11 Hasil Positif *Salmonella* pada Uji Katalase



Gambar 4.12 Hasil Pertumbuhan *Salmonella* pada Uji Manitol

LAMPIRAN 5

Jumlah Koloni *Salmonella spp.*

Tabel 5.1 Jumlah Koloni *Salmonella spp.* dari Peternakan ayam

No.	Peternakan Ayam	Jenis Sampel	Jumlah Koloni 3 Pengulangan (10^7 cfu/ml)*	P.1	P.2	P.3	Xi	Xi-X	$(Xi-X)^2$
1.	Mertojoyo	Feses	148	78	38	32	49,3	19,65	386,12
		Pakan	-	-	-	-	-	-	-
		Air minum	174	73	49	52	58	28,35	803,72
2.	Sawojajar	Feses	98	26	38	34	32,6	2,95	8,70
		Pakan	-	-	-	-	-	-	-
		Air minum	114	63	37	14	38	8,35	69,72
Jumlah			534				177,9		1268,26
Rata-rata							29,65		

*Rerata jumlah bakteri dihitung dari duplikat sampel yang ditanam pada duplikat cawan dengan 3 ulangan.

Nilai keragaman antar isolat :

1. Sd Feses di Mertojoyo = $\sqrt{\frac{386,12}{3}}$ = 11,34
2. Sd Air minum di Mertojoyo = $\sqrt{\frac{803,72}{3}}$ = 16,36
3. Sd Feses di Sawojajar = $\sqrt{\frac{8,70}{3}}$ = 1,70
4. Sd Air minum di Sawojajar = $\sqrt{\frac{69,72}{3}}$ = 4,82

LAMPIRAN 6

Profil Koloni *Salmonella spp.*

Tabel 6.1 Profil Koloni *Salmonella spp.* secara Makroskopis dan Mikrokopis

No	Isolat	Makroskopis				Mikroskopis		
		Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna	Bentuk	Gram	Warna
1.	F13A	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Pink	Batang	-	Merah
2.	F13B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
3.	F15A	*Irregular*	Rata	*Convex*	Putih	Batang	-	Merah
4.	F23A	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
5.	F23B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
6.	F25A	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
7.	F25B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
8.	F25B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
9.	F26A	*Circular*	Rata	*Convex*	Putih	Batang	-	Merah
10.	F26B	*Circular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
11.	F16A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
12.	F16B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
13.	F17A	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
14.	F17B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
15.	A13A	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
16.	A13B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
17.	F17B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
18.	F27A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
19.	F27B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
20.	F25A	*Irregular*	Cembung	*Convex*	Hitam	Batang	-	Merah
21.	F25B	*Irregular*	Cembung	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
22.	F23B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
23.	F23A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

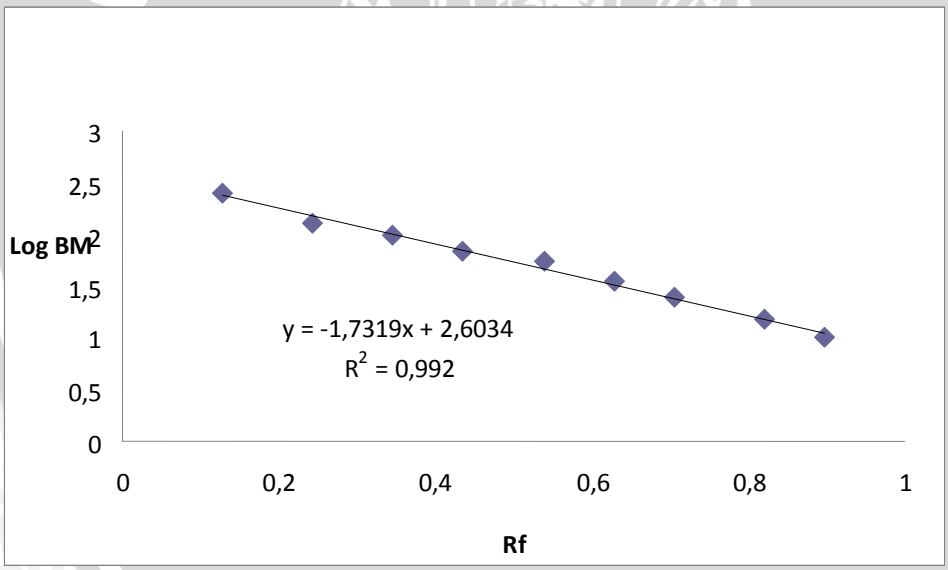
24.	F17A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
25.	F15B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
26.	F15A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
27.	F13A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
28.	F13B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
29.	A17B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
30.	A17A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
31.	A15A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
32.	A15B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
33.	A13B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
34.	A13A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah
35.	A27B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Merah	Batang	-	Merah
36.	A27A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Merah	Batang	-	Merah
37.	A25B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Kuning	Batang	-	Merah
38.	A25A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
39.	A23B	*Irregular*	Rata	*Flat*	Putih	Batang	-	Merah
40.	A23A	*Irregular*	Rata	*Flat*	Hitam	Batang	-	Merah

LAMPIRAN 7

Kurva Standar Berat Molekul Protein Marker

Tabel 7. 1 Perhitungan persamaan regresi protein marker

No	BM	Jarak awal (cm)	Jarak akhir (cm)	Rf	Log BM
1	250	1	7,8	0,128205	2,39794
2	130	1,9	7,8	0,24359	2,113943
3	100	2,7	7,8	0,346154	2
4	70	3,4	7,8	0,435897	1,845098
5	55	4,2	7,8	0,538462	1,740363
6	35	4,9	7,8	0,628205	1,544068
7	25	5,5	7,8	0,705128	1,39794
8	15	6,4	7,8	0,820513	1,176091
9	10	7	7,8	0,897436	1



Gambar 7.1 Kurva Standar Protein Marker (*PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder Plus* dengan berat molekul 10-250 kDa

LAMPIRAN 8

Berat Molekul Protein Isolat yang Terdeteksi

Tabel 8.1 Berat molekul protein isolat A13A1

	J.AW	J.AK	Rf	Log BM	BM
1	1,6	7,8	0,205128205	2,248138	177,0673
2	2,5	7,8	0,320512821	2,048304	111,7645
3	3	7,8	0,384615385	1,937285	86,5535
4	3,3	7,8	0,423076923	1,870673	74,246
5	4,2	7,8	0,538461538	1,670838	46,8639
6	4,5	7,8	0,576923077	1,604227	40,20008
7	4,8	7,8	0,615384615	1,537615	34,48382
8	5,5	7,8	0,705128205	1,382188	24,10951
9	6	7,8	0,769230769	1,271169	18,67107

Tabel 8.2 Berat molekul protein isolat A13B2

	J.AW	J.AK	Rf	Log BM	BM
1	3,3	7,8	0,423076923	1,870673	74,246
2	4,2	7,8	0,538461538	1,670838	46,8639
3	4,5	7,8	0,576923077	1,604227	40,20008
4	4,9	7,8	0,628205128	1,515412	32,7651
5	5,5	7,8	0,705128205	1,382188	24,10951
6	6	7,8	0,769230769	1,271169	18,67107

Tabel 8.3 Berat molekul protein isolat A15A

	J.AW	J.AK	Rf	Log BM	BM
1	4,9	7,8	0,628205128	1,515412	32,7651
2	5,5	7,8	0,705128205	1,382188	24,10951

Tabel 8.4 Berat molekul protein isolat F25A

	J.AW	J.AK	Rf	Log BM	BM
1	1,5	7,8	0,192307692	2,247423	176,7759
2	2,3	7,8	0,294871795	2,079115	119,9818
3	3,3	7,8	0,423076923	1,868731	73,91469
4	3,9	7,8	0,5	1,7425	55,27134
5	4,7	7,8	0,602564103	1,559819	36,2927
6	5,2	7,8	0,666666667	1,4488	28,10606
7	5,5	7,8	0,705128205	1,382181	24,10912

Tabel 8.5 Berat molekul protein isolat F25B

	J.AW	J.AK	Rf	Log BM	BM
1	1,5	7,8	0,192307692	2,270342	186,3555
2	3,3	7,8	0,423076923	1,870673	74,246
3	4,7	7,8	0,602564103	1,559819	36,2927
4	5,5	7,8	0,705128205	1,382188	24,10951

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA