



Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri *Salmonella* Asal Tempe Dage Berdasarkan Gen 16S rRNA

¹*Mazidah Noer Inayah, ²Suci Indah Budiarti, ³Rahayu Wulan

^{1,2}Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Yakpermas Banyumas,
Banyumas, Indonesia.

³Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar, Magelang, Indonesia

*Corresponding Author e-mail: mazidahni@gmail.com

Received: October 2025; Revised: November 2025; Accepted: December 2025; Published: December 2025

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella* pada tempe dage, khususnya yang beredar di pasar tradisional di wilayah Banyumas, Jawa Tengah dan mengidentifikasinya berdasarkan analisis molekuler gen 16S rRNA. Isolasi bakteri *Salmonella* dari sampel dage dilakukan dengan metode kulturasi menggunakan beberapa jenis media selektif *Salmonella*. Identifikasi bakteri *Salmonella* dilakukan dengan uji biokimia (fisiologis) menggunakan API 20E dan molekuler berdasarkan analisis gen 16S rRNA dengan teknik PCR. Selanjutnya, hasil sekuensing gen 16S rRNA dianalisis dengan fitur BLAST pada NCBI dan rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan aplikasi MEGA X. Hasil penelitian diperoleh 1 isolat bakteri (TD.1) dengan ciri koloni transparan dan bagian tengah berwarna hitam pada media SSA. Uji biokimia katalase, fermentasi gula, produksi H₂S, serta pemanfaatan sitrat menunjukkan hasil positif. Pengujian lanjut dengan API 20E menunjukkan bahwa isolat TD.1 adalah *Salmonella*. Isolat TD.1 teridentifikasi sebagai *Salmonella enterica* berdasarkan analisis molekuler gen 16S rRNA. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri TD.1 yang berhasil diisolasi dari tempe dage teridentifikasi sebagai jenis bakteri *Salmonella enterica*. Keberadaan bakteri tersebut pada dage menunjukkan adanya potensi risiko terhadap kesehatan dan menegaskan perlunya peningkatan higienitas pangan di pasar tradisional.

Kata Kunci: Bakteri; patogen bawaan pangan; *Salmonella*; tempe dage; 16S rRNA

Abstract: This study aimed to isolate *Salmonella* from tempe dage, particularly products sold in traditional markets in the Banyumas region, Central Java, and to identify the isolates through molecular analysis of the 16S rRNA gene. Isolation of *Salmonella* from dage samples was conducted using culture-based methods on several types of selective media specific for *Salmonella*. Identification was performed through biochemical characterization using the API 20E system and molecular analysis based on PCR amplification of the 16S rRNA gene. The resulting 16S rRNA sequences were subsequently analyzed using the BLAST tool available on the NCBI platform, and phylogenetic relationships were reconstructed with MEGA X. The study successfully obtained one bacterial isolate (TD.1), exhibiting transparent colonies with black centers on SSA medium. Biochemical tests including catalase activity, sugar fermentation, H₂S production, and citrate utilization showed positive results. Further identification using the API 20E system confirmed that isolate TD.1 belonged to the genus *Salmonella*. Molecular analysis of the 16S rRNA gene identified isolate TD.1 as *Salmonella enterica*. In conclusion, isolate TD.1, recovered from tempe dage was identified as *Salmonella enterica*. The presence of *Salmonella enterica* in dage highlights a potential health risk and underscores the need for improved food hygiene in traditional markets.

Keywords: Bacteria; foodborne pathogen; *Salmonella*; tempe dage; 16S rRNA

How to Cite: Inayah, M. N., Budiarti, S. I., & Wulan, R. (2025). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri *Salmonella* Asal Tempe Dage Berdasarkan Gen 16S rRNA. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(4), 2635–2647. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i4.18200>



<https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i4.18200>

Copyright© 2025, Inayah et al

This is an open-access article under the CC-BY-SA License.



PENDAHULUAN

Salmonella merupakan salah satu jenis bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit salmonellosis pada manusia (Balasubramanian et al., 2019; Wotzka et al., 2017). Salmonellosis merupakan penyakit endemik yang tersebar luas di sebagian besar wilayah perkotaan di Indonesia. Setiap tahunnya, jumlah kasus dilaporkan berkisar antara 60.000 hingga 1.3 juta, dengan angka kematian mencapai sekitar 20.000 kasus (Elsyaningrat et al., 2022).

Sebagian besar infeksi *Salmonella* disebabkan oleh makanan yang terkontaminasi, sehingga *Salmonella* dikenal sebagai bakteri patogen yang menular melalui makanan (*foodborne*) (Pinedo *et al.*, 2022). Sumber bahan pangan yang menjadi kontributor terbesar dalam penularan *Salmonella* adalah unggas (misalnya karkas ayam) (Nurjanah *et al.*, 2021; Rizki *et al.*, 2022). Bahan pangan berupa telur, daging babi, daging sapi, ikan, kerang, bahkan sayuran dan buah-buahan juga menjadi media penularan *Salmonella* (Elsyaningrat *et al.*, 2022; Ferrari *et al.*, 2019; Risdianti *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2019). Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa bahan pangan terfermentasi oleh kapang *Rhizopus* sp. seperti tempe kedelai rentan terkontaminasi *Salmonella*. Hal ini dapat terjadi karena proses pembuatannya kurang higienis atau penyajian saat penjualannya tidak memperhatikan kebersihan (Pop *et al.*, 2024; Wicaksono *et al.*, 2024).

Pangan fermentasi dilaporkan tidak rentan terhadap cemaran *Salmonella*. Bahkan, proses fermentasi yang benar dapat menghambat pertumbuhan bakteri berbahaya seperti *Salmonella*. Proses fermentasi menghasilkan asam, yang menurunkan pH dan menciptakan lingkungan yang tidak menguntungkan bagi *Salmonella* (Aguirre-garcia *et al.*, 2024; Zapa *et al.*, 2022). Meski demikian, risiko pangan fermentasi tetap bisa menjadi sumber kontaminasi jika prosesnya tidak dilakukan dengan benar, bahan baku mentah terkontaminasi (tidak higienis), peralatan yang tidak steril, udara sekitar yang tercemar atau terjadi kontaminasi silang selama produksi atau penanganan (Ehuwa *et al.*, 2021; Id *et al.*, 2022).

Di Banyumas, terdapat bahan pangan tradisional hasil fermentasi kapang *Rhizopus* sp. yang sangat diminati banyak orang, yaitu tempe dage. Bahan pangan tersebut terbuat dari sisa ekstraksi minyak kelapa (bungkil) yang diinokulasi dengan starter kapang *Rhizopus* sp. dan dibungkus dengan daun pisang selama proses fermentasi. Dage banyak dijual di pasar tradisional di wilayah Banyumas. Akan tetapi, dalam proses penjualan tersebut dage disajikan dalam bentuk yang sudah dipotong dengan ukuran sekitar 15×7×3 cm tanpa pembungkus. Hal ini dapat menyebabkan risiko kontaminasi bakteri patogen dari lingkungan pasar. Selain itu, proses pengolahan dage menjadi makanan siap saji dilakukan tanpa mencuci dage terlebih dahulu, sehingga bagian permukaan luar dage juga dikonsumsi. Proses pembuatan atau pengolahan dage juga masih sederhana dan tradisional, sehingga menimbulkan risiko terjadinya kontaminasi silang bakteri *Salmonella* pada bahan pangan tersebut.

Meskipun dage merupakan salah satu bahan pangan yang sangat diminati masyarakat dan menjadi makanan khas daerah Banyumas, akan tetapi informasi mengenai penelitian yang berkaitan dengan pemeriksaan mikroba pada dage masih sangat terbatas, termasuk identifikasi adanya cemaran bakteri *Salmonella*. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa berdasarkan analisis metagenomik (*uncultured*) terdapat bakteri *S. bongori* pada dage (Eshananda *et al.*, 2023). Namun demikian, penelitian berbasis kulturasi tentang keberadaan bakteri *Salmonella* pada dage belum dilaporkan. Oleh karena itu, analisis atau kajian terkait isolasi dan identifikasi bakteri *Salmonella* pada dage melalui pendekatan biologi molekuler (*Polymerase Chain Reaction*) perlu dilakukan.

Analisis molekuler gen 16S rRNA dapat diaplikasikan untuk mengidentifikasi suatu bakteri, termasuk *Salmonella*. Gen 16S rRNA bersifat sebagai penanda universal dengan daerah konservatif yang stabil secara evolusioner serta daerah variabel yang memungkinkan diferensiasi antar sepsies. Analisis dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rRNA menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik, diikuti dengan sekuensing (pemeriksaan pola nukleotida spesifik), yang kemudian dicocokkan atau dibandingkan dengan basis data sekuen referensi (*database global*).

Pendekatan molekuler ini memungkinkan deteksi yang cepat dan akurat. Selain itu, teknik analisis molekuler ini dinilai lebih sensitif dibandingkan metode kultur dan karakterisasi biokimia konvensional (Bukin et al., 2019).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini perlu dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Salmonella* dari tempe dage berdasarkan pendekatan molekuler gen 16S rRNA. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar pemetaan atau investigasi epidemiologi salmonellosis pada bahan pangan (*foodborne diseases*), khususnya bahan pangan lokal tradisional fermentasi seperti dage yang pengolahannya sebagian besar masih dilakukan secara konvensional. Secara praktis, temuan ini menjadi informasi yang bermanfaat bagi otoritas pengawasan pangan, pelaku industri pangan, produsen lokal, serta masyarakat untuk meningkatkan praktik higienitas serta strategi mitigasi risiko paparan *Salmonella* pada produk pangan lokal.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif dengan pendekatan observasional cross-sectional. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai September 2025.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: mesin *thermal cycler* (PCR), spektrofotometer Nanodrop, mesin sekuensing Sanger, elektroforesis, gel-documentation system, *laminar air flow cabinet* (LAFC), neraca analitik, mikroskop, inkubato, dan autoklaf.

Bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya: sampel dage dari pasar tradisional di wilayah Banyumas, media *Buffer Peptone Water* (BPW), media *Shigella-Salmonella Agar* (SSA), media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS), media *Tryptic Soy Agar* (TSA), media *simmon citrate*, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), API 20E kit (Biomerieux), kristal violet, safranin, iodine, alkohol, hidrogen peroksida (H₂O₂), MyTaq HS Red Mix (Bioline, BIO-25048), Kit ekstraksi DNA genom Quick-DNA Magbead Plus Kit (Zymo Research, D4082), primer 27F/1492R (Abellan-Schneyder et al., 2021), *Nuclease Free Water* (NFW), gel agarose, bufer TAE, *loading dye*, dan 1 kb *ladder*.

Pengambilan Sampel

Sampel dage diperoleh dari 3 pasar tradisional di Wilayah Banyumas, Jawa Tengah. Sampel dage dari masing-masing pasar dipilih secara acak dari 3 pedagang atau penjual dage, sehingga total berjumlah 9 sampel. Seluruh sampel dage dikemas menggunakan plastik steril yang dilengkapi dengan label kode sampel, lalu disimpan di dalam *cooler box*, kemudian dibawa ke laboratorium Mikrobiologi untuk dianalisis pada hari yang sama.

Isolasi Bakteri *Salmonella* dari Tempe Dage

Bagian permukaan luar sampel dage dipisahkan (dipotong) dengan pisau steril. Bagian luar tersebut tidak digunakan dalam penelitian. Sebanyak 25 gram sampel dage ditimbang, dicampurkan ke dalam 225 mL media BPW, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Selanjutnya, sebanyak 1 mL campuran media BPW dan dage tersebut diinokulasikan pada media RVS 10 mL lalu diinkubasi selama 24 jam. Tahapan selanjutnya, biakan dari media RVS diinokulasikan ke media SSA, kemudian diinkubasi 24 jam untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Salmonella*.

Karakterisasi Isolat Bakteri

Koloni bakteri yang tumbuh dan berwarna hitam pada media SSA dikarakterisasi secara morfologi (koloni dan sel) maupun fisiologis. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan pewarnaan Gram. Karakterisasi fisiologis dilakukan dengan beberapa pengujian biokimia meliputi uji katalase, oksidase, fermentasi glukosa, produksi H₂S, produksi indol, serta penggunaan sitrat. Selain itu, isolat bakteri juga dikarakterisasi secara biokimia menggunakan *Analytical Profile Index* (API) 20E.

Ekstraksi DNA Genom Bakteri

Ekstraksi atau isolasi DNA genom bakteri dilakukan dengan menggunakan Kit Quick-DNA Magbead Plus Kit (Zymo Research, D4082). Tahapan ekstraksi DNA dilakukan sesuai prosedur baku yang telah tertera pada Kit Protokol.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Amplifikasi gen 16S rRNA bakteri dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan menggunakan Kit MyTaq HS Red Mix 2x. Reaksi PCR disiapkan dengan total volume 25 µl yang terdiri atas 1 µl DNA genom (22 ng/µl), 12.5 µl MyTaq HS Red Mix, masing-masing 2.5 µl primer 27F dan 1492R, serta 6.5 µl NFW. Kondisi PCR dilakukan melalui tahapan awal denaturasi pada 95 °C selama 5 menit, diikuti 30 siklus yang meliputi denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, penempelan primer pada 55 °C selama 45 detik, dan pemanjangan DNA pada 72 °C selama 1 menit. Produk PCR kemudian divisualisasi menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 0.8% dengan marker 1 kb *ladder*.

Sekuensing Gen 16S rRNA

Penentuan urutan (sekuens) gen 16S rRNA bakteri dilakukan menggunakan jasa Laboratorium PT. Genetika Science Indonesia (PT.GSI) dengan teknik sekuensing dua arah menggunakan mesin sekuensing Sanger DNA *Sequencing by Using Capillary Electrophoresis*. Seluruh prosedur penelitian dilakukan berdasarkan protokol yang berlaku di PT.GSI.

Analisis Data Hasil Sekuensing Gen 16S rRNA

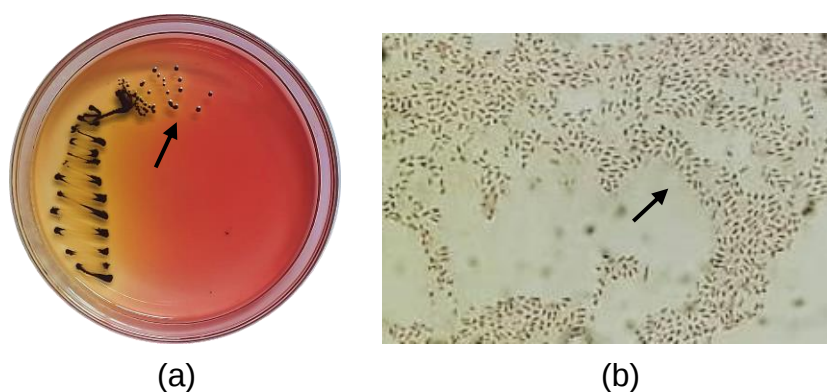
Hasil sekuensing dilanjutkan pada tahapan analisis bioinformatika menggunakan aplikasi Bioedit dan Seqtrace. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan aplikasi MEGA X berdasarkan sekuens referensi pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan fitur atau program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri *Salmonella* dari sampel tempe dage diperoleh satu isolat yang diduga merupakan bakteri *Salmonella* (isolat TD1). Koloni bakteri TD1 terlihat berwarna transparan dan terdapat endapan hitam di tengah koloni saat ditumbuhkan pada media SSA setelah diinkubasi 24 – 48 jam (Gambar 1a). Media SSA berfungsi sebagai media selektif-diferensial yang memungkinkan untuk mendeteksi dan menumbuhkan bakteri *Salmonella* sekaligus menghambat bakteri lainnya (non-target).

Saat ditumbuhkan pada media SSA, bakteri *Salmonella* akan tampak berwarna transparan serta terdapat endapan hitam di tengah koloni. Endapan hitam tersebut terbentuk karena bakteri *Salmonella* memiliki kemampuan memproduksi hidrogen sulfida (H₂S) melalui metabolisme asam amino yang mengandung sulfur, seperti sistein, yang kemudian bereaksi dengan garam besi yang terkandung pada media SSA (Evangelopoulou et al., 2024).

Hasil karakterisasi morfologi koloni bakteri TD1 memperlihatkan bahwa isolat tersebut berbentuk bulat dengan tepian koloni halus/ rata, permukaan mengkilap, dan elevasi cembung. Hasil karakterisasi sel bakteri TD1 menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki bentuk sel batang (basil) dengan penataan menyebar, tidak berspora, serta merupakan bakteri Gram negatif (Gambar 1b). Hal tersebut sesuai dengan karakteristik atau ciri morfologi sel bakteri *Salmonella* yang dilaporkan sebelumnya oleh (Kankanawadi *et al.*, 2022). Akan tetapi, identifikasi suatu isolat bakteri berdasarkan fenotipenya, baik secara morfologi sel maupun koloni pada saat ditumbuhkan pada media spesifik tidak cukup untuk menentukan jenis atau spesies bakteri tersebut (Arbefeveille *et al.*, 2024). Oleh karena itu, dilakukan beberapa uji lanjutan yaitu uji biokimia (fisiologis) untuk memperkuat dugaan bahwa isolat TD1 adalah *Salmonella*.



Gambar 1. (a) Koloni isolat bakteri TD1 asal dage pada media SSA setelah inkubasi 24 jam, (b) Morfologi sel bakteri TD1 setelah pewarnaan Gram

Hasil uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa isolat bakteri TD1 memiliki ciri fisiologis sebagaimana tercantum dalam Tabel 1 dibawah ini. Pengujian biokimia digunakan untuk menentukan identitas serta karakteristik suatu bakteri dengan mengamati pola aktivitas metabolisme yang dimilikinya. Secara umum, uji biokimia dilakukan untuk menentukan genus atau spesies bakteri tertentu (Sukmawati *et al.*, 2023).

Tabel 1. Karakteristik fisiologis isolat bakteri *Salmonella* asal dage

Jenis Uji Biokimia	Hasil
Katalase	+
Oksidase	-
Methyl Red (MR)	+
Voges Proskauer (VP)	-
Produksi H ₂ S	+
Produksi Indol	-
Penggunaan Sitrat	+

Hasil positif dan negatif suatu uji biokimia ditentukan berdasarkan hasil reaksi metabolik yang muncul. Reaksi positif pada uji katalase ditunjukkan oleh pembentukan gelembung udara akibat aktivitas enzim katalase yang dihasilkan oleh bakteri. Enzim tersebut dapat menguraikan hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air (H₂O) dan gas oksigen (O₂). Uji oksidase negatif menunjukkan bahwa isolat bakteri tidak memiliki

enzim sitokrom c oksidase. Hal ini ditunjukkan oleh tidak adanya perubahan atau pembentukan warna biru-keunguan pada strip oksidase (Shoaib *et al.*, 2020).

Isolat bakteri TD1 juga mampu memfermentasi glukosa. Hasil ini ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna media uji MR dari merah menjadi jingga-kekuningan serta adanya pembentukan gelembung gas. Perubahan warna media disebabkan oleh penurunan pH yang dipengaruhi oleh produk asam hasil fermentasi glukosa oleh bakteri (Shoaib *et al.*, 2020).

Disamping itu, hasil uji biokimia juga menunjukkan bahwa isolat bakteri TD1 juga memiliki kemampuan memproduksi H_2S , yang ditunjukkan dengan adanya pembentukan warna hitam pada dasar media TSIA. Warna hitam tersebut merupakan hasil reaksi antara natrium tiosulfat yang terkandung dalam media dan H_2S yang diproduksi oleh bakteri (Bhattacharyya *et al.*, 2023). Isolat bakteri TD1 juga mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon, yang ditandai dengan perubahan warna media simmon citrate dari hijau menjadi kebiruan. Perubahan warna ini diakibatkan oleh perubahan pH atau derajat keasaman media (Shoaib *et al.*, 2020). Akan tetapi, isolat bakteri asal dage ini tidak memiliki kemampuan memproduksi indol ataupun membentuk asetoin. Hasil uji biokimia isolat bakteri TD1 sesuai dengan penelitian (Chaudhary *et al.*, 2024; Utami *et al.*, 2025) yang telah dilakukan sebelumnya.

Untuk memperkuat dugaan bahwa isolat bakteri asal dage tersebut adalah bakteri *Salmonella*, pengujian dilanjutkan dengan menggunakan API 20E. Kit API 20E merupakan metode pengujian berbasis uji biokimia yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mendiferensiasi bakteri Gram-negatif, khususnya anggota famili Enterobacteriaceae seperti bakteri dari genus *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, dan *Proteus* (Turki *et al.*, 2023).

Hasil pengujian API 20E menunjukkan bahwa isolat TD1 merupakan bakteri dari genus *Salmonella* sp (Tabel 2). Meski demikian, identifikasi isolat bakteri berbasis fisiologis biokimia (termasuk API 20E) hanya bisa menduga atau mengidentifikasi secara akurat sampai dengan tingkatan genus. Identifikasi bakteri pada taksa spesies, subspecies hingga serovar atau serotipe harus diuji lanjut dengan menggunakan analisis molekuler (Arbefeville *et al.*, 2024; Hafezi & Khamar, 2024).

Tabel 2. Hasil identifikasi isolat bakteri TD1 dengan API 20E

Significant Taxa (Genus)	Persentase Identifikasi (%ID)	T (Confidence level)
<i>Salmonella</i> spp	99.9%	0.25

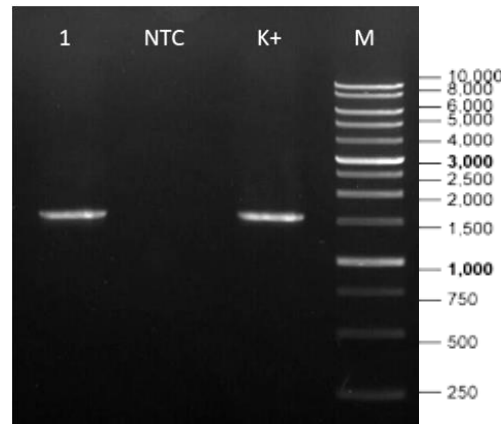
Keterangan : T = *Typicity index*

(T ≥ 0.25 hasil identifikasi baik, T < 0.25 hasil identifikasi meragukan/ perlu ditinjau kembali)

Analisis molekuler menunjukkan bahwa gen 16S rRNA isolat bakteri TD1 asal dage berhasil di amplifikasi (Gambar 2). Primer yang digunakan dalam PCR memiliki urutan: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'. Primer tersebut spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri dengan panjang produk sekitar 1500 pb (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021).

RNA ribosomal 16S (16S rRNA) adalah salah satu komponen penyusun 30S subunit kecil ribosom prokariot. Sekuen (urutan basa nitrogen) dari gen 16S rRNA umum digunakan sebagai marker molekuler. Hal ini disebabkan karena urutan basa nitrogen pada gen 16S rRNA relatif konservatif namun beberapa daerah justru bervariasi (*hypervariable region*). Gen 16S rRNA memiliki 9 daerah hypervariable (V1 – V9) yang sangat berguna untuk mengidentifikasi prokariot pada tingkatan taksa tertentu. Urutan basa nitrogen konservatif pada gen 16S rRNA mencerminkan

perubahan yang relatif lambat (evolusi) sedangkan urutan basa nitrogen yang bervariasi dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman (Bukin *et al.*, 2019; Inayah *et al.*, 2022). Umumnya, suatu prokariot yang memiliki urutan basa nitrogen dengan derajat kesamaan 97% atau lebih dianggap sebagai satu spesies (Akihary & Kolondam, 2020; Noer, 2021). Oleh karena itu, pada penelitian ini gen 16S rRNA digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri TD1 asal dage.



Keterangan:

Kode 1 : Bakteri TD1 asal dage
 NTC : Kontrol Negatif (*No Template Control*)
 K+ : Kontrol Positif (gDNA *E. coli* ATCC 25922)
 M : 1 kb DNA ladder (2,5 µL)

Gambar 2. Hasil amplifikasi dengan PCR gen 16S rRNA (~1500 bp) isolat bakteri TD1 asal dage setelah divisualisasi pada gel agarose 0.8% dalam buffer TAE

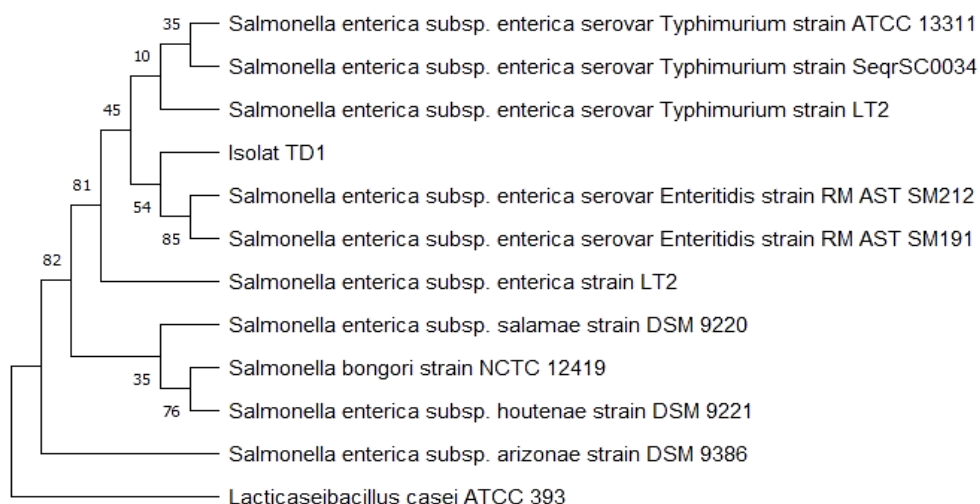
Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat bakteri TD1 memperlihatkan ukuran gen sebesar 1417 pb (pasang basa). Berdasarkan hasil analisis, sekuens gen 16S rRNA dari isolat bakteri TD1 menunjukkan tingkat kemiripan (*percentage identity*) sekitar 98% dengan isolat bakteri *Salmonella enterica* yang terdapat pada gene bank (Tabel 3). Oleh karena itu, disimpulkan bahwa isolat bakteri TD1 merupakan spesies *Salmonella enterica*. (Azwar, 2022) menyebutkan bahwa jika nilai similaritas gen $\geq 98\%$, maka isolat bakteri tersebut akan cenderung diidentifikasi sebagai spesies yang sama. Hal tersebut didukung oleh (Johnson *et al.*, 2019) bahwa suatu bakteri dikategorikan setara pada tingkat spesies jika nilai persentase kemiripannya $>97.5\%$, sedangkan pada tingkat genus apabila nilai tersebut lebih dari 95%.

Tabel 3. Hasil analisis similaritas gen 16S rRNA isolat bakteri TD1 dengan bakteri referensi yang terdapat di *gene bank*

Sampel	Bakteri Referensi	Similaritas (% Identity)	Query Cover	Nomor Aksesi
Isolat bakteri asal tempe dage (TD1)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain SeqrSC0034	98.4%	100%	MH548461.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis strain RM AST SM212	98.3%	100%	MK809236.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	98.3%	100%	MK809231.1

Sampel	Bakteri Referensi	Similaritas (% Identity)	Query Cover	Nomor Aksesi
	strain RM AST SM191			
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain LT2	98.1%	100%	NR_104709.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain ATCC 13311	97.9%	100%	NR_119108.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain LT2	97.6%	100%	NR_074910.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. salamae strain DSM 9220	97.4%	100%	NR_044372.1
	<i>Salmonella bongori</i> strain NCTC 12419	97.2%	100%	NR_074888.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> strain DSM 9221	97.1%	100%	NR_044371.1
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> strain DSM 9386	96.5%	100%	NR_116125.1

Keakuratan nilai similaritas gen 16S rRNA isolat bakteri TD1 dengan bakteri referensi dapat dikonfirmasi dengan merekonstruksi pohon filogenetik (Gambar 2). Pada penelitian ini, rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *neighbor-joining*. Metode *neighbor-joining* merupakan salah satu metode rekonstruksi filogenetik berdasarkan matriks perbedaan jarak genetik. Makin besar jarak genetik (pasangan urutan) maka kekerabatan suatu organisme makin jauh, begitu pula sebaliknya (Chen & Wang, 2022; Zahin *et al.*, 2025).



Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri TD1 asal dage yang direkonstruksi dengan metode *neighbor-joining* dan model Kimura-2-parameter (1000× bootstrap)

Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat bakteri TD1 memiliki kedekatan genetik (kekerabatan) dan berada dalam satu klade (monofiletik) dengan isolat *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis. Kelompok tersebut

berada dalam satu klade dengan kelompok *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium. Berdasarkan hal tersebut isolat TD1 diduga merupakan bakteri *Salmonella* serovar Enteritidis. *Salmonella Enteritidis* seringkali ditemukan pada bahan pangan seperti telur, daging, karkas ayam, dan produk susu (Hashemi et al., 2025; Omar et al., 2018). *Salmonella* Enteritidis termasuk jenis serovar *Salmonella* teratas yang bertanggung jawab atas infeksi pada manusia selain serovar Typhimurium, Derby, Hadar, dan Infantis (Baek et al., 2024; Omar et al., 2018). Akan tetapi, identifikasi serovar bakteri *Salmonella* memerlukan pengujian lebih lanjut, salah satunya dengan analisis gen spesifik (Grinevich et al., 2024; Ranjbar et al., 2017; Santos et al., 2020; Sayed et al., 2023) maupun analisis *whole genome sequencing* (WGS) bakteri (Deng et al., 2025; Ibrahim & Morin, 2018; Vakili et al., 2025).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis biokimia (fisiologis) dan molekuler gen 16S rRNA pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri TD.1 asal tempe dage teridentifikasi sebagai jenis bakteri *Salmonella enterica*. Keberadaan *Salmonella enterica* pada dage menunjukkan adanya potensi risiko terhadap kesehatan dan menegaskan perlunya peningkatan higienitas pangan di pasar tradisional di wilayah Banyumas.

REKOMENDASI

Penelitian dapat dilanjutkan pada tahapan identifikasi subspecies dan jenis serovar bakteri *Salmonella enterica* asal tempe dage dengan pendekatan molekuler (PCR) atau analisis keseluruhan genom bakteri (*whole genome sequencing*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DPPM), Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan, Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi (KEMDIKTISAINTEK) atas dukungan pendanaan penelitian skema PDP melalui program BOPTN Penelitian tahun 2025 (Nomor Kontrak 127/C3/DT.05.00/PL/2025, tanggal 28 Mei 2025; No. 0129/LL6/PL/AL.04/2025 tanggal 29 Mei 2025; dan No. 184/P.Yak/VII/2025 tanggal 9 Juni 2025).

DAFTAR PUSTAKA

- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20>
- Aguirre-garcia, Y. L., Nery-flores, S. D., Campos-muzquiz, L. G., Flores-gallegos, A. C., Palomo-ligas, L., & Alberto, J. (2024). Lactic Acid Fermentation in the Food Industry and Bio-Preservation of Food. *Fermentation*, 10(168). <https://doi.org/10.3390/fermentation10030168>
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Utilization of the 16S rRNA gene as a bacterial identification device for research in Indonesia. *Pharmakon*, 9(1), 16–22.
- Arbefeville, S. S., Timbrook, T. T., & Garner, C. D. (2024). Evolving strategies in microbe identification - a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 79, 12–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae275>
- Azwar, S. M. (2022). Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Gen 16S rRNA Bakteri

- Lipolitik Asal Limbah Kulit Biji Jambu Mete Isolation and Molecular Characterization of Lipolytic Bacterial 16S rRNA Gene from Cashew Nutshell Waste. *Jurnal Sumberdaya HAYATI*, 8(1), 20–26. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/sumberdayahayati>
- Baek, S. H., Lim, C. G., Park, J. Il, Seo, Y. B., & Nam, I. S. (2024). Investigation of *Salmonella enteritidis* Growth under Varying Temperature Conditions in Liquid Whole Egg: Proposals for Smart Management Technology for Safe Refrigerated Storage. *Foods*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/foods13193106>
- Balasubramanian, R., Im, J., Lee, J. S., Jeon, H. J., Mogeni, O. D., Kim, J. H., Rakotozandrindrainy, R., Baker, S., & Marks, F. (2019). The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15(6), 1421–1426. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1504717>
- Bhattacharyya, Roy, & Das. (2023). Overview on Old and New Biochemical Test for Bacterial Identification. *Journal of Surgical Case Reports and Images*, 6(5), 01–11. <https://doi.org/10.31579/2690-1897/163>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Chanamé Pinedo, L., Mughini-Gras, L., Franz, E., Hald, T., & Pires, S. M. (2022). Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015–2019: An analysis of outbreak data. *International Journal of Food Microbiology*, 379(2). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109850>
- Chaudhary, A., Solanki, S., & Gurjar, D. (2024). Biochemical characterization of *Salmonella* species isolated from calf diarrhoea. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 9(1), 1034–1037.
- Chen, W., & Wang, H. (2022). Phylogenetic Tree Selection by Testing Substitution Number in Clade. *Diversity*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/d14070543>
- Deng, X., Li, S., Xu, T., Zhou, Z., Moore, M. M., Timme, R., Zhao, S., Lane, C., Dinsmore, B. A., Weill, F. X., & Fields, P. I. (2025). Serotype interpretation from DNA sequence data. *Applied and environmental Microbiology*, 91(3).
- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods*, 10(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods10050907>
- Elsyaningrat, I. G. A. I. G., Pinatih, K. J. P., Fatmawati, N. N. D., & Darwinata, A. E. (2022). Prevalensi cemaran patogen *Salmonella* pada daging babi yang dijual di Pasar Tradisional di Kota Denpasar. *Intisari Sains Medis*, 13(2), 328–334. <https://doi.org/10.15562/ism.v13i2.1381>
- Eshananda, Y., Fikriyya, N., & Fadlilah, S. H. (2023). Deteksi Molekuler Bakteri Patogen pada Makanan Fermentasi Tempe Dage berdasarkan marka gen 16S rRNA. *Agropross: National Conference Proceedings of Agriculture*, 591–598. <https://doi.org/10.25047/agropross.2023.491>
- Evangelopoulou, G., Burriel, A. R., & Solomakos, N. (2024). Distinctive Culture Expressions of Enterobacteria Interfering with Isolation of *Salmonella* spp. during the Application of the Recommended ISO 6579-1:2017. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/app14030953>
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., & Conte-Junior, C. A. (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14), 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>

- Grinevich, D., Harden, L., Thakur, S., Callahan, B., Grinevich, D., Harden, L., Thakur, S., & Callahan, B. (2024). Serovar-level identification of bacterial foodborne pathogens from full-length 16S rRNA gene sequencing. *Computational Biology*, 9(3), 1–18.
- Hafezi, A., & Khamar, Z. (2024). The Method and Analysis of Some Biochemical Tests Commonly Used for Microbial Identification: A Review. *Comprehensive Health and Biomedical Studies*, 3(2). <https://doi.org/10.5812/chbs-160199>
- Hashemi, M., Erfani, A., Asadi Touranlou, F., Doustinouri, M., Shahraki, A., & Afshari, A. (2025). Identification of Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, and Clostridium perfringens in hospital food. *Revista Argentina de Microbiologia*, 57(1), 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.11.005>
- Ibrahim, G. M., & Morin, P. M. (2018). Salmonella serotyping using whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9(12), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>
- Id, R. C., Nguyen-viet, H., Tum, S., Unger, F., Lindahl, J., Grace, D., Ty, C., Koam, S., Sina, V., Sokchea, H., Pov, S., Heng, T., Phirum, O., & Dang-xuan, S. (2022). Experimental cross-contamination of chicken salad with Salmonella enterica serovars Typhimurium and London during food preparation in Cambodian households. *PLoS ONE*, 1, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270425>
- Inayah, M. N., Lestari, Y., & Meryandini, A. (2022). Community of Soil Actinobacteria in PTPN VI Oil Palm Plantation Jambi (Sumatra, Indonesia) Based on Amplicon Sequencing of 16S rRNA Gene. *HAYATI Journal of Biosciences*, 29(3), 389–398. <https://doi.org/10.4308/hjb.29.3.389-398>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kankanawadi, R., Awati, B., & Kage, S. (2022). Isolation, cultural and morphological characterization of Salmonella Spp. from diarrhoeic cases of Pigs. *The Pharma Innovation Journal*, 11(10), 1176–1181.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.30998/edubiologia.v1i1.8596>
- Nurjanah, S., Rahayu, W. P., Dewanti-Hariyadi, R., Asthiti, N. G. A. M. W., & Melati, R. P. (2021). Simpleks Dan Multipleks Pre-Enrichment-PCR Untuk Deteksi Salmonella Enteritidis DAN Typhimurium Pada Karkas Ayam. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 32(1), 148–156. <https://doi.org/10.6066/jtip.2021.32.2.148>
- Omar, D., Al-Ashmawy, M., Ramadan, H., & El-Sherbiny, M. (2018). Occurrence and PCR identification of Salmonella spp. from milk and dairy products in Mansoura, Egypt. *International Food Research Journal*, 25(1), 446–452.
- Pop, O. L., Ciont, C., Gabianelli, R., Coldea, T. E., Pop, C. R., Mudura, E., Min, T., Rangnoi, K., Yamabhai, M., Vlaic, R., Mureşan, C., & Suharoschi, R. (2024). Deciphering contaminants and toxins in fermented food for enhanced human health safeguarding. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(5). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13428>
- Ranjbar, R., Mojtaba, S., Mehrabi, A., Sarshar, M., Najafi, A., & Soruri, R. (2017). Simultaneous Molecular Detection of Salmonella enterica Sero. *Iran J Public Health*, 46(1), 103–111. <http://ijph.tums.ac.ir>

- Risdayanti, R., Latif, U. T. A., & Wirawan, H. P. (2023). Deteksi keberadaan bakteri pengkontaminasi pangan *Salmonella* sp. pada telur. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 3(3), 117–121. <https://doi.org/10.24252/filogeni.v3i3.29811>
- Rizki, R. P., Arifin, M. Z., & Aini, I. (2022). Identification of *Salmonella* Sp Bacterial Contamination in Broiler Chicken at Pon Market, Jombang Regency. *Medicra (Journal of Medical Laboratory Science/Technology)*, 5(1), 6–10. <https://doi.org/10.21070/medicra.v5i1.1621>
- Santos, P. D. M., Widmer, K. W., & Rivera, W. L. (2020). PCR-based detection and serovar identification of *Salmonella* in retail meat collected from wet markets in Metro Manila, Philippines. *PLoS ONE*, 15(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239457>
- Sayed, R., Ewida, R. M., & Sayed, M. (2023). Isolation and molecular identification of salmonella from fermented foods. *Journal of Applied Molecular Biology*, 1(1), 73–82. <https://doi.org/10.21608/jamb.2023.218073.1006>
- Shoaib, M., Muzammil, I., Hammad, M., Bhutta, Z. A., & Yaseen, I. (2020). A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. *International Journal of Research Publications*, 54(1). <https://doi.org/10.47119/ijrp100541620201224>
- Sukmawati, S., Ratna, R., Sipriyadi, & Yunita, M. (2023). Characterization and molecular identification of bacteria from mackerel bekasam in Sorong City, Southwest Papua Province, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(9), 4967–4977. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240940>
- Turki, Y., Mehri, I., Khessairi, A., Agrebi, K., Hassen, A., & Ouzari, H. (2013). Identification of three related genera, *Salmonella*, *Citrobacter* and *Proteus* using API 20E, 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer fingerprinting and 16S rDNA sequencing. *Academic Journals*, 7(29), 3874–3884. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5466>
- Vakili, S., Haeili, M., Feizi, A., Moghaddasi, K., Omrani, M., Ghodousi, A., & Cirillo, D. M. (2025). Whole-genome sequencing-based characterization of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis and Kentucky isolated from laying hens in northwest of Iran, 2022–2023. *Gut Pathogens*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-025-00679-3>
- Wicaksono, W. A., Akinyemi, O. E., Wassermann, B., Bickel, S., Suwanto, A., & Berg, G. (2024). Traditionally produced tempeh harbors more diverse bacteria with more putative health-promoting properties than industrially produced tempeh. *Food Research International*, 196(9), 115030. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115030>
- Wotzka, S. Y., Nguyen, B. D., & Hardt, W. D. (2017). *Salmonella* Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. *Cell Host and Microbe*, 21(4), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.009>
- Wulan Agus Utami, A., Sari, D. D., Nirmalasari, Roza Sani Aidah, Rusdi, & Sari Utami Hidayati. (2025). Identification of *Salmonella* sp. bacteria Using ISO 6579-1:2017 Method for Frozen Salmon (*Salmo salar*) Products. *Journal Of Biology Education Research (JBER)*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.55215/jber.v6i1.6>
- Yang, X., Wu, Q., Zhang, J., Huang, J., Chen, L., Wu, S., Zeng, H., Wang, J., Chen, M., Wu, H., Gu, Q., & Wei, X. (2019). Prevalence, bacterial load, and antimicrobial resistance of salmonella serovars isolated from retail meat and meat products in China. *Frontiers in Microbiology*, 10(9), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02121>

- Zahin, T., Abrar, M. H., Jewel, M. R., Tasnim, T., Bayzid, M. S., & Rahman, A. (2025). An alignment-free method for phylogeny estimation using maximum likelihood. *BMC Bioinformatics*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-025-06080-w>
- Zapa, A., Sokolowska, B., Bryla, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, 11(1283), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>