BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella* sp.

2.1.1 Definisi dan Morfologi

Salmonella pertama kali dideskripsikan pada tahun 1880 oleh Eberth dan dikulturkan pada tahun 1884 oleh Gaffky. Strain dibedakan berdasarkan reaksinya terhadap sera, dan selama beberapa dekade setiap serotipe baru diberi penunjukan spesies baru (misalnya, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, dan *Salmonella dublin*). Secara umum diterima sekarang bahwa hanya ada satu spesies *Salmonella* (*Salmonella enterica*) dari pada lebih dari 2.000 serotipe tetapi sebagian besar peneliti terus menulis, misalnya, "*Salmonella typhimurium*" daripada "*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*" (Heran et al., 1999).

Bakteri *Salmonella* adalah bakteri motil, gram negatif, berbentuk batang yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini bersifat anaerobik intraseluler fakultatif, berbentuk batang, dan tidak membentuk spora, bergerak menggunakan flagel *peritrichous*. Genom *Salmonella* bervariasi dari 4460 hingga 4857 kb tergantung pada serotipe dengan panjang 2–5 μm dan lebar 0,5–1,5 μm. Bakteri *Salmonella* sp. tumbuh cepat dalam media yang sederhana. Pada biakan agar membentuk koloni dengan ukuran koloni 2-8 μm, berbentuk bulat agak cembung, jernih, mengkilap putih kekuningan (Ehuwa et al., 2021; Gut et al., 2018).

Bakteri *Salmonella* menghasilkan hidrogen sulfida, memfermentasi laktosa (pada beberapa subspesies), dan bersifat katalase dan oksidase positif. Sebagai satu-satunya sumber karbon, ia menghidrolisis urea, menggunakan sitrat, dan mendekarboksilasi lisin. Bakteri Gram negatif ini juga bersifat motil, tumbuh optimum pada suhu 37 °C dan pH 6-8. *Salmonella* sp. diketahui bertahan untuk waktu yang lama dalam produk makanan dengan kelembaban rendah. Bakteri *Salmonella* adalah anaerob fakultatif yang secara biokimia dikarakterisasi dengan kemampuannya memfermentasi glukosa yang memproduksi asam dan gas, dan ketidakmampuannya menggunakan laktosa dan sukrosa (Asefa dan Duga, 2022).

Salmonella sp. merupakan salah satu bakteri patogen yang seringkali sebagai penyebab utama infeksi yang ditularkan melalui makanan atau *foodborne disease*. *Salmonella* sp. dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti penyakit diare, *salmonellosis*, *gastroenteritis*, demam tifus, sepsis, serta penyakit infeksi lainnya (Ning, 2023).

2.1.2 Taksonomi dan Klasifikasi

Klasifikasi *Salmonella* menurut Madigan et al. (2021) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
Divisi : *Proteobacteria*
Kelas : *Gamma proteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Salmonella* sp
Spesies : *Salmonella* sp

Bakteri *Salmonella* sp. merupakan bakteri yang bersifat anaerob fakultatif yang mempunyai sifat Gram negatif, berbentuk seperti batang, mempunyai flagel peritrik untuk bergerak, motil, tidak berspora, dan memiliki ukuran 1-3 µm x 0,5-0,8 µm. Bakteri *Salmonella* sp. tumbuh pada suasana aerob dan anaerob fakultatif pada suhu 15-41℃ dengan suhu pertumbuhan optimum 37,5℃. Bakteri yang menyebabkan tifoid adalah *Salmonella typhi* dan *paratyphi* yang merupakan anggota dari Genus *Salmonella* sp. (Madigan et al., 2021).

2.1.3 *Salmonella* pada Makanan

Habitat bakteri *Salmonella* sp. yaitu di dalam alat pencernaan manusia, hewan, dan bangsa burung. Cara penularannya melalui mulut yang tercemar makanan atau minuman yang tercemar. *Salmonella* sp. bisa terdapat di makanan dalam jumlah banyak, tetapi tidak selalu menyebabkan perubahan di dalam hal warna, bau, ataupun rasa dari makanan itu. Tingginya jumlah bakteri *Salmonella* pada makanan, menyebabkan gejala infeksi pada manusia yang mengkonsumsi dan semakin cepat waktu inkubasi sampai terjadi gejala infeksi. Makanan yang biasanya terkontaminasi bakteri *Salmonella* sp. contohnya seperti telur unggas dan olahannya, ikan laut dan hasil olahannya, daging unggas seperti ayam, daging sapi,

dan susu sapi, serta hasil olahannya seperti es krim, sosis, dan keju (Agustini et al., 2020).

Kontaminasi yang terjadi pada makanan dan minuman dapat menyebabkan berubahnya makanan tersebut menjadi media bagi suatu penyakit. Penyakit yang ditimbulkan oleh makanan yang terkontaminasi disebut penyakit bawaan makanan (*foodborne disease*). Menurut laporan WHO (*World Health Organization*) yang diterbitkan pada tahun 2015, tercatat hampir 600 juta kasus penyakit yang disebabkan oleh makanan yang terkontaminasi, termasuk hampir 350 juta yang disebabkan oleh bakteri patogen. Penyakit bakteri yang berasal dari hewan, misalnya yang disebabkan oleh *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Listeria* sp. atau famili *Enterobacteriaceae*, merupakan risiko kesehatan yang serius baik di negara berkembang maupun di negara maju. Diperkirakan bahwa di Amerika Serikat, jumlah keracunan makanan dapat mencapai 48 juta kasus per tahun dengan *salmonellosis* dan *campylobacteriosis* sebanyak 2 juta orang per tahun (Chlebicz dan Śliżewska, 2018). Menurut Permenkes (2011) penyakit bawaan pada makanan disebabkan oleh virus, bakteri, amoeba atau protozoa, parasit, dan penyebab bukan kuman. Salah satu mikroba patogen yang menyebabkan keracunan makanan adalah *Salmonella* sp.. *Salmonella* adalah penyebab utama dari penyakit yang disebarkan melalui makanan (*foodborne disease*) di dunia. *Foodborne disease* adalah suatu penyakit yang diakibatkan karena mengkonsumsi makanan dan minuman yang sudah tercemar. Pada umumnya, serotipe *Salmonella* sp. menyebabkan penyakit pada organ pencernaan. Penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* disebut *Salmonellosis* (Ekawati et al., 2019; Wahyuni, 2022).

Salmonella enterica subspecies *enterica* adalah salah satu patogen bawaan makanan yang paling utama dan agen penyebab yang paling sering dilaporkan dalam wabah yang ditularkan melalui makanan bakteri dan menyebabkan jumlah kematian tertinggi akibat penyakit yang ditularkan melalui makanan di Uni Eropa pada tahun 2017. Sebagian besar kasus *salmonellosis* pada manusia dikaitkan dengan konsumsi makanan yang terkontaminasi *Salmonella* yaitu daging unggas telah diidentifikasi sebagai salah satu sumber utama penyebab penyakit. Menurut *European Food Safety Authority and The European Centre for Disease Prevention and Control* (EFSA and ECDC), di Uni Eropa pada tahun 2018 ada lima serovar

teratas yang paling sering dilaporkan menyebabkan *salmonellosis* pada manusia adalah *Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium, Salmonella Typhimurium monofasik, Salmonella Infantis,* dan *Salmonella Derby*. *Salmonella Enteritidis* dilaporkan terutama terkait dengan telur dan daging broiler sedangkan *Salmonella Infantis* terutama dikaitkan dengan daging ayam (Zeng et al., 2021).

2.1.4 Patogenesis Akibat *Salmonella*

Salmonella sp. dapat berkembang biak di dalam alat pencernaan penderita, kemudian terjadi radang pada usus. Manusia dapat bertindak sebagai *carrier* setelah terinfeksi dan menyebarkannya melalui *feses* untuk waktu yang cukup lama, selain itu dapat juga terisolasi dari tanah, air, dan sampah yang terkontaminasi *feses*. *Salmonella* sp. di dalam tubuh akan menginvasi mukosa usus halus, berbiak di sel epitel dan menghasilkan toksin yang akan menyebabkan reaksi radang dan akumulasi cairan di dalam usus. Kemampuan *Salmonella* sp. untuk menginvasi dan merusak sel berkaitan dengan diproduksinya *thermostable cytotoxic factor*. *Salmonella* ada di dalam sel epitel akan memperbanyak diri dan menghasilkan *thermo labile enterotoxin* yang secara langsung mempengaruhi sekresi air dan elektrolit. Patogenesis yang disebabkan oleh *Salmonella* sp. dapat terjadi dalam tiga tahap, yaitu kolonisasi usus, perusakan lapisan sel epitel usus, penggertakan pengeluaran cairan (Pasue et al., 2016).

Sekitar 2.000 serotipe *Salmonella* dikaitkan dengan enterocolitis tetapi pada waktu tertentu ada kumpulan yang lebih kecil yaitu sekitar 10 serotipe yang menyebabkan sebagian besar infeksi termasuk *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, dan *Salmonella heidelberg*. Masa inkubasi pada bakteri ini biasanya 6 sampai 48 jam dan diikuti dengan sakit kepala, sakit perut, diare, dan muntah. Diare dapat mengandung darah, limfosit, dan lendir. Demam, malaise, dan nyeri otot merupakan gejala yang cukup umum dan gejala ini biasanya sembuh dalam waktu seminggu tetapi *Salmonella* dapat keluar melalui tinja hingga 20 minggu oleh anak-anak <5 tahun dan selama 8 minggu oleh orang dewasa. Anak-anak terutama yang berusia <1 tahun dan orangtua yang berusia di atas 60 tahun paling rentan terhadap penyakit dan cenderung bisa mengalami infeksi yang lebih parah. Penyakit yang sering disebabkan oleh *Salmonella* sp. seperti demam tifoid (tifus), *salmonellosis*, dan *gastroenteritis* (Cita, 2011; Heran et al., 1999).

2.1.5 Identifikasi

2.1.5.1 Ciri Khas Organisme

Salmonella sp. adalah koloni bakteri gram negatif, anaerob fakultatif, dan berbentuk batang lurus berukuran 0,70 – 1,50 x 2,00 – 5,00 μm, serta tidak memiliki kemampuan untuk membentuk spora (*non-sporulating*). *Salmonella* umumnya memiliki flagella tipe *peritrichous* sehingga memiliki kemampuan motilitas sel (kecuali serotipe *gallinarum* atau *pullorum*), memiliki fimbriae, membentuk koloni berdiamter antara 2-4 μm (kecuali serotip *abortusovis*), bersifat patogen, dan mudah beradaptasi dengan inang (*host*). *Salmonella* dapat tumbuh optimum di berbagai kondisi lingkungan di luar inang. *Salmonella* sp. dapat tumbuh optimal pada suhu 35-37 ^{o}C dan pH 6,50-7,50. *Salmonella* membutuhkan aktivitas air tinggi (aw) antara 0,99 dan 0,94 (Fatiqin et al., 2019; Gut et al., 2018).

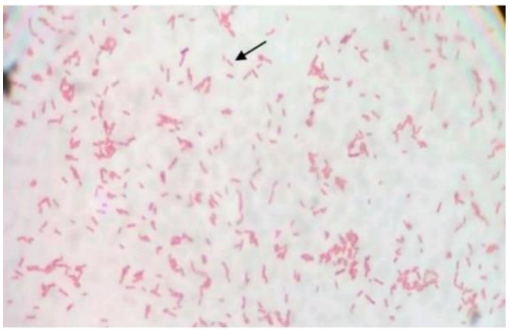
Salmonella dapat tumbuh pada biakan agar dan akan membentuk koloni dengan ukuran koloni 2-8 µm, berbentuk bulat agak cembung, jernih, mengkilap putih kekuningan. *Salmonella* akan menghasilkan batang warna merah muda pada pewarnaan gram pada pemeriksaan mikroskopis. *Salmonella* dapat memfermentasikan glukosa, memproduksi gas, namun tidak memfermentasikan laktosa dan sukrosa (Sari et al., 2018).

2.1.5.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Gram positif merupakan organisme yang dapat menahan kompleks pewarnaan primer ungu methylen blue sampai pada akhir prosedur (sel-sel tampak biru gelap atau ungu), sedangkan Gram negatif adalah organisme yang kehilangan kompleks warna methylen blue pada waktu pembilasan dengan alkohol namun kemudian terwarnai oleh pewarna tandingan safranin (sel tampak merah muda) (Pagala et al., 2023).

Prosedur kerja dari pewarnaan gram ini yaitu membersihkan preparat glass dengan menggunakan alkohol 70% kemudian difiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah preparat glass. Sebelum pengambilan bakteri, dipijarkan jarum ose pada bunsen kemudian dicelupkan kedalam akuades selanjutnya dipijarkan kembali jarum ose dan diambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan di atas preparat glass, selanjutnya teteskan larutan zat warna methylen blue

sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik, cuci dengan akuades dan keringkan preparat di atas bunsen, kemudian teteskan 1-2 tetes larutan lugol selama 1 menit kemudian bilas dengan alkohol 70 % dan dicuci dengan akuades, kemudian tetes larutan safranin sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik kemudian bilas dengan akuades kembali dikeringkan dan diamkan, terakhir diamati dibawah mikroskop. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda. Pada pengecatan bakteri *Salmonella* sp. pewarnaan gram menunjukkan Gram negatif. *Salmonella* sp. dalam pewarnaan Gram ditandai dengan bentuk batang dan warna merah, ciri-ciri ini dapat diamati sebagaimana ditunjukkan oleh tanda panah pada Gambar 2.1 (Pagala et al., 2023).



Gambar 2.1 Salmonella sp. *pada Pewarnaan Gram (Perbesaran 40x) (Pagala et al., 2023)*

2.1.5.3 Uji Biakan Bakteri

Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) termasuk kedalam media selektif, yakni media pertumbuhan koloni yang dapat digunakan untuk memilih koloni satu jenis bakteri dari koloni-koloni yang lain. Media agar ini sering dipakai untuk identifikasi *Enterobacteriaceae* salah satunya adalah bakteri *Salmonella*. Koloni *Salmonella* pada pertumbuhan koloni di media SSA koloni putih transparan, kecil-kecil, *smooth*, bulat, cenderung cembung, dan pinggir rata (Faizah dan Tridayanti, 2022). Bakteri yang mengandung Hidrogen Sulfida (H_2S) central koloni berwarna

hitam karena ada indikator ferri sitrat/ferri sulfat, karakteristik tersebut ditunjukkan oleh tanda panah pada Gambar 2.2.



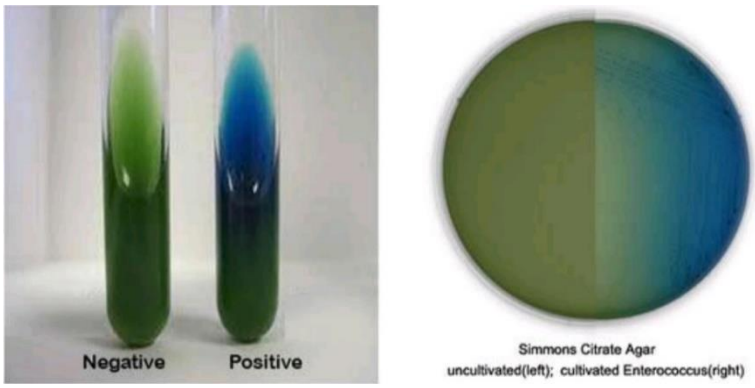
Gambar 2.2 Salmonella pada Salmonella Shigella Agar
Sumber: https://www.infolabmed.com/2019/08/isolasi-dan-identifikasi-bakteri-salmonella-sp.html

Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) termasuk kedalam media identifikasi yang merupakan rangkaian uji biokimia untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasikan gula yang terkandung di dalam media TSIA, yakni glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hasil ini digunakan untuk membedakan bakteri yang termasuk kelompok *Enterobacteriaceae* yang bersifat gram negatif dan memfermentasi glukosa kemudian membentuk asam sehingga dapat dibedakan dengan bakteri gram negatif lain. Media yang digunakan mempunyai dua bagian, yaitu *slant* (miring) dan *butt* (tusuk). Uji ini untuk melihat kemampuan kuman meragi gula dan membentuk H_2S. Adanya bakteri *Salmonella* ditandai dengan adanya lereng berwarna merah dan bagian bawahnya berwarna kuning (M/K), gas H_2S (+) sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Faizah & Tridayanti, 2022; Kursia, 2019).



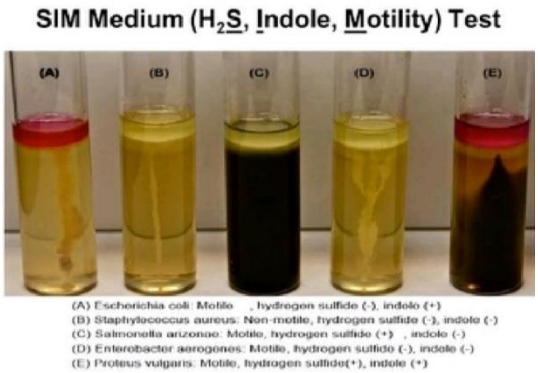
Gambar 2.3 Salmonella pada Triple Sugar Iron Agar
Sumber: https://microbiologie-clinique.com/triple-sugar-iron-agar.html

Media *Simmons Citrate Agar* (SCA) termasuk ke dalam media identifikasi yang dilakukan dengan menumbuhkan *Salmonella-Shigella*. Uji sitrat merupakan uji yang dilakukan untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam memfermentasikan sitrat sebagai sumber karbon yang terkandung pada media dengan bantuan enzim citrate permease sehingga menyebarkan sitrat ke dalam sel yang ditandai dengan terbentuknya perubahan warna pada media uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Jika terjadi perubahan warna dari hijau menjadi biru (sitrat difermentasikan) maka bakteri yang tumbuh positif *Salmonella* sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Simmons, 1926).



Gambar 2.4 Salmonella pada Simmons Citrate Agar
Sumber: https://www.microbeholic.com/2020/11/simmons-citrate-agar-sca-definisi-komposisi-cara-pembuatan-dan-interpretasi-uji.html

Media *Sulfide Indole Motility* (SIM) merupakan media semi solid berwarna krem. Isolat bakteri yang telah diperoleh diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM tegak, lalu diinkubasi pada suhu 37ºC selama 2x24 jam. Uji *Sulfide Indole Motility* (SIM) bertujuan mengetahui pergerakan bakteri. Hasil positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut dinyatakan bergerak (motil) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar, hanya yang didapatkan berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non-motil). Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif pada uji SIM yang ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, bergerak (motil) dan ada atau tidak adanya H_2S. Pada uji ini *Salmonella* terlihat pergerakan (motilitas) pada media yang ditusuk dengan ose dan warna media SIM berubah menjadi hitam sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.5 (Heryawati et al., 2016).



Gambar 2.5 Salmonella pada Sulfide Indole Motility
Sumber: https://teknologilaboratoriummedik.blogspot.com/2016/11/media-sulfide-indole-motility-sim.html

2.2 Ikan Tuna (*Thunnus* sp.)

Tuna adalah ikan laut yang terdiri dari beberapa spesies dari famili *Scombridae*, terutama genus *Thunnus*. Tidak seperti biasanya ikan yang memiliki daging berwarna putih, daging tuna berwarna merah muda sampai merah tua. Hal ini disebabkan otot tuna lebih banyak mengandung myoglobin dari pada ikan lainnya. Beberapa spesies tuna yang lebih besar, seperti tuna sirip biru, dapat menaikkan suhu darahnya di atas suhu air dengan aktivitas ototnya. Hal ini menyebabkan mereka dapat hidup di air yang lebih dingin dan dapat bertahan dalam kondisi yang beragam. Tuna adalah ikan yang memiliki nilai komersial tinggi, dan kebanyakan bertubuh besar (Darondo, 2014).

2.2.1 Klasifikasi Ikan Tuna

Klasifikasi Ikan Tuna menurut Sahubawa (2018) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*
Filum : *Chordata*
Kelas : *Teleostei*
Subkelas : *Actinopterygii*
Ordo : *Perciformes*
Subordo : *Scombridae*
Famili : *Scombridae*
Genus : *Thunnus*
Species : *Thunnus albacares (yellowfin tuna)*
Thunnus obesus (bigeye tuna)
Thunnus maccoyii (bluefin tuna)

Thunnus alalunga (albacore)

2.2.2 Produk Ikan Tuna

Dengan melihat ikan tuna yang bernilai tinggi dan banyaknya permintaan di pasar dunia menjadikan perkembangan industri perikanan tuna nasional demikian pesat, tidak hanya produk tuna yang dibekukan (*frozen tuna*) dan produk tuna segar (*fresh tuna*), tapi juga dalam bentuk tuna kaleng (*canning tuna*) atau olahan lainnya. Khusus untuk produk tuna segar (*fresh tuna*), dikembangkan kapal-kapal yang berukuran lebih kecil (< 60 *Gross Tonnage*) dinilai lebih efisien dan ekonomis dengan lama operasi tidak lebih dari 2 minggu untuk menjaga mutu produk tersebut.

Ikan tuna pada umumnya bukan hanya dapat diekspor secara utuh, tapi dapat juga diolah dalam beberapa macam jenis olahan atau produk khususnya untuk kualitas ekspor. Beberapa jenis olahan ikan tuna menurut Kementerian Perdagangan RI (2012):

1. Tuna Saku

Selama ini konsumsi ikan tuna untuk kualitas ekspor adalah dalam bentuk utuh. Namun, karena tingginya permintaan produk olahan ikan dalam bentuk tuna saku dan loin dari negara importir, sehingga menciptakan peluang usaha pengolahan ikan tuna dalam bentuk tersebut.



Gambar 2.6 Tuna Saku
(Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, 2023)

2. Katsuobushi

Merupakan makanan yang diawetkan berbahan baku ikan cakalang (katsuo). Katsuobushi diserut menjadi seperti serutan kayu untuk diambil kaldunya yang merupakan bahan dasar masakan Jepang, ditaburkan di atas makanan sebagai penyedap rasa, atau dimakan begitu saja sebagai teman makan nasi. Pengawetan ikan cakalang menjadi katsuobushi umum dilakukan di beberapa negara seperti Jepang dan kepulauan Maladewa. Teknik pengawetan ikan menjadi katsuobushi sudah dikenal di Jepang sejak sebelum zaman Edo.



Gambar 2.7 Katsuobushi
(Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, 2023)

3. Cook Tuna Loin

Cook tuna loin merupakan jenis olahan tuna yang mengalami proses perebusan dan pemasakan yang biasanya dikemas dalam plastik yang ditujukan untuk pasar ekspor. Cook tuna loin terdiri atas beberapa spesifikasi dan dari beberapa ukuran.



Gambar 2.8 Cook Tuna Loin
(Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, 2023)

Menurut SNI 8919 tahun 2020 tentang daging tetelan ikan tuna beku menyebutkan bahwa syarat fisik daging tetelan ikan tuna beku dari segi suhu pusat maksimum -18^{o}C. Syarat mutu kimia daging tetelan ikan tuna beku pada kadar air adalah maksimum 75%. Syarat mutu cemaran mikroba daging tetelan ikan tuna beku pada Angka Lempeng Total (ALT) adalah 10^5–10^6 koloni/g, syarat mutu *Escherichia coli* 1–10 APM/g, dan cemaran *Salmonella* Negatif/25 g.

2.3 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatis yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Pelipat gandaan ini membutuhkan enzim

spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu *Adenine* (A), *Thymine* (T), *Cytosine* (C) dan *Guanine* (G) (Gibbs, 1990). Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya (Yuwono, 2006).

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan *real time*. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi pada agar elektroforesis. Sedangkan PCR *real time*, jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR (Hewajuli et al., 2014).

2.3.1 *Polymerase Chain Reaction* Konvensional

Reaksi PCR konvensional biasanya menggunakan satu pasang primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi bagian tertentu dari genom agen infeksi serta dilakukan pada suatu tabung. Primer PCR adalah oligo deoksiribonukleotida pendek, atau oligomer yang dirancang untuk melengkapi urutan akhir sekuen dari amplikon target PCR dan digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Panjang basa DNA primer umumnya 15-25 nukleotida dan mempunyai 50-60% kandungan *Guanin* ditambah *Cytokine*. Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Masing-masing dari dua primer PCR melengkapi untaian tunggal yang berbeda dari target untaian ganda. Untuk mendapatkan skrining sekuen yang potensial dan homolog, rancangan primer ditetapkan dengan menggunakan perangkat lunak seperti Oligo (*National Biosciences*, *Plymouth*, NC) atau situs pencarian online seperti BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLA ST/). Namun demikian, primer PCR juga dapat

homopolimer misalnya oligo (dT) yang sering digunakan untuk mengawali proses PCR RNA.

Proses amplifikasi RNA didahului dengan siklus *reverse transcriptase* (RT) yang berlangsung pada suhu 42-55^{o}C. Proses PCR dibagi menjadi tiga tahap. Pertama, denaturasi cetakan DNA beruntai ganda pada suhu di atas 90^{o}C sehingga menjadi DNA cetakan berantai tunggal. Kedua, penempelan (*annealing*) primer oligonukleotida ke DNA cetakan beruntai tunggal biasanya pada suhu 50-60^{o}C sehingga primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu dimana primer *annealing* biasanya diistilahkan dengan Tm. Ketiga, perpanjangan atau ekstensi fragmen DNA dengan enzim polimerase dan primer untuk menghasilkan kopi DNA yang dapat berfungsi sebagai DNA cetakan untuk siklus selanjutnya yang berlangsung pada suhu 70-78^{o}C. Kedua DNA cetakan asli dan target yang teramplifikasi selanjutnya berfungsi sebagai substrat untuk proses denaturasi, penempelan primer dan perpanjangan fragmen DNA. Berdasarkan teori, setiap siklus akan menggandakan jumlah kopi target DNA sehingga terjadi amplifikasi geometri. Amplifikasi DNA target sebanyak 25 siklus akan menghasilkan 33 juta kopi. Setiap penambahan 10 siklus menghasilkan 1024 lebih kopi. Rataan perubahan suhu atau tahapan lamanya inkubasi di setiap suhu dan jumlah waktu setiap siklus yang diulang, dikontrol dengan suatu program dari alat *thermal cycler*. Jumlah siklus amplifikasi PCR harus dioptimasi tergantung pada konsentrasi awal DNA target (Pringle, 1999). Minimal diperlukan 25 siklus untuk dapat melipatgandakan satu kopi sekuen DNA target sehingga hasil PCR dapat dilihat secara langsung dengan menggunakan agar elektroforesis.

2.3.2 *Polymerase Chain Reaction Real Time*

Selama beberapa tahun terakhir, pengujian PCR *real time* yang berdasarkan fluoresensi menjadi suatu metode pengujian yang sering digunakan untuk deteksi RNA, DNA dan *cDNA*. Teknik ini sangat sensitif yang memungkinkan amplifikasi terjadi secara bersama sama serta kuantitas sekuens asam nukleat dapat diketahui. Disamping memiliki sensitivitas lebih tinggi, kelebihan pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan PCR konvensional adalah lebih dinamis, risiko kontaminasi silang lebih sedikit, kemampuan aplikasi penggunaannya untuk

pengujian lebih banyak (Black et al., 2002). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *real time* tepat untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan genotipe *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Penggunaan *probe* yang spesifik membantu peningkatan spesifisitas pada pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan pengujian PCR konvensional (Chantratita et al., 2008). Namun demikian, PCR *real time* juga mempunyai kelemahan yaitu memerlukan peralatan dan reagen yang mahal serta pemahaman teknik yang benar untuk hasil yang akurat.

Tahapan-tahapan umum yang dilakukan selama pengujian PCR *real time* dimulai dari isolasi RNA atau DNA sampai analisis data. Prinsip kerja PCR *real time* adalah mendeteksi dan mengidentifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Peningkatan hasil amplifikasi PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi target gen. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal., 2010). Kuantitas urutan DNA target dicapai dengan menentukan jumlah siklus amplifikasi. Jumlah siklus amplifikasi diperlukan untuk menghasilkan produk PCR berdasarkan fluoresensi di awal fase eksponensial PCR serta untuk melewati garis ambang fluoresensi/siklus *threshold* (Ct). Jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai ambang batas disebut Ct. Siklus Ct adalah prinsip dasar dari PCR *real time* dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat. Nilai Ct PCR *real time* sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target (Giglio et al., 2003). Apabila kuantitas urutan DNA target tinggi di awal reaksi, nilai Ct akan lebih cepat diketahui. Namun demikian, nilai Ct akan lebih sering ditemukan pada fase eksponensial di setiap siklus amplifikasi PCR. Hal ini yang menjadi alasan utama bahwa nilai Ct lebih mampu mengukur jumlah amplifikasi DNA target dari awal reaksi.

Meskipun RT-PCR *real time* (rRT-PCR) merupakan suatu pengujian diagnostik yang sensitif dan spesifik serta banyak digunakan untuk deteksi penyakit secara cepat, tetapi adanya kemungkinan reaksi negatif palsu dapat terjadi. Reaksi

ini kemungkinan disebabkan oleh adanya penghambat RT-PCR, ekstraksi virus RNA yang sedikit atau sudah terdegradasi, kesalahan personel laboratorium dalam melakukan pengujian rRT-PCR dan kualitas dari salah satu reagen yang sudah kadaluarsa. Sampel yang diperiksa dapat mengandung substansi penghambat PCR yang memungkinkan menghasilkan hasil negatif palsu. Penghambat amplifikasi PCR dapat dideteksi dengan kontrol internal. Kontrol internal merupakan faktor yang sangat penting sebagai kontrol dari kualitas pengujian sehingga pengujian dilakukan secara benar (Das et al., 2006).

Penerapan tipe kontrol internal positif yang berbeda pada pengujian rRT-PCR telah dikembangkan untuk menguji sampel klinik. Berdasarkan sifatnya terhadap target cetakan DNA, kontrol internal positif dibagi menjadi dua, yaitu kompetitif dan nonkompetitif. Kontrol internal positif kompetitif menggunakan suatu rancangan tiruan yang digunakan untuk mengikat bagian primer yang sama dengan sekuen internal sehingga dapat dibedakan dari sekuen target baik ukuran maupun *probe*-nya. Kontrol internal positif nonkompetitif menggunakan sekuen target yang berbeda dan memiliki primer atau *probe* yang berbeda sehingga tidak digunakan untuk mengamplifikasi target amplikon serta berkompetitif secara tidak langsung dengan target amplikon (Abdulmawjood et al., 2002; Dingle et al., 2004).

Penggunaan kontrol yang spesifik, yaitu kontrol positif dan negatif serta pengendalian mutu reagen sebagai salah satu pelaksanaan program jaminan mutu dari suatu laboratorium sangat diperlukan selama pengujian sehingga hasil yang diperoleh akurat. Kontrol positif yang dapat digunakan adalah sampel yang mengandung organisme atau asam nukleat yang dapat dideteksi. Konsentrasi kontrol positif yang digunakan harus mampu memberikan hasil positif yang konsisten. Air atau *buffer* sering digunakan sebagai kontrol negatif. Namun demikian, kontrol negatif yang bagus adalah sampel yang mengandung asam nukleat selain target untuk mengetahui tidak adanya amplifikasi PCR non-spesifik atau amplifikasi produk. Selain itu, kontrol negatif digunakan untuk menunjukkan bahwa reagen yang digunakan tidak terkontaminasi dengan asam nukleat target (NCCLS, 1995). Jaminan mutu reagen sangat penting untuk memastikan keberhasilan pengujian PCR *real time* (Burgos et al., 2002). Biasanya, komponen

master mix yang mengandung konsentrasi reagen baku telah tersedia secara komersial tetapi tidak selalu tersedia untuk primer dan *probe* FRET.



Gambar 2. 9 Thermal Cycler
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2025)

2.3.3 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA adalah proses untuk memperbanyak fragmen DNA secara *in vitro* (di luar organisme hidup), sehingga jumlah salinan DNA meningkat dari satu atau beberapa salinan menjadi jutaan hingga milyaran salinan. Teknik ini sangat penting dalam biologi molekuler, forensik, diagnostik medis, dan penelitian genetik. Teknik paling umum untuk amplifikasi DNA adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dikembangkan oleh Kary Mullis (1983). PCR memanfaatkan enzim DNA polimerase yang tahan panas untuk mereplikasi segmen DNA tertentu melalui siklus suhu yang terdiri dari denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan ekstensi.

Terdapat tiga tahapan dalam Amplifikasi DNA (PCR) diantaranya:

1. Denaturasi (95°C): Memisahkan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal.
2. *Annealing* (50–65°C): Primer menempel pada sekuens target pada DNA cetakan.
3. *Extension* (72°C): Enzim DNA polimerase memperpanjang primer menjadi untai DNA baru. Proses ini biasanya diulang selama 25–35 siklus untuk menghasilkan jumlah DNA yang cukup untuk analisis (Corpuz et al., 2020; Kubista et al., 2006).

2.3.4 Fluorofor FAM (6-*Carboxy fluorescein*)

FAM (6-c*arboxy fluorescein*) yang dikenal sebagai saluran pewarna paling umum karena dapat tereksitasi dengan baik pada panjang gelombang 488 nm dan memberikan sinyal yang kuat saat dikonjugasikan ke oligonukleotida (Kubista et al., 2006). FAM biasanya digunakan untuk menandai probe spesifik target DNA

dalam *assay mix* sehingga memungkinkan deteksi spesifik selama reaksi PCR berlangsung (Heid et al., 1996).

2.3.5 Fluorofor ROX (6-*Carboxy-X-Rhodamine*)

Dalam Applied Biosystems (2003) ROX (*carboxy-X-rhodamine*) berfungsi sebagai *passive reference dye* dalam *master mix*. ROX digunakan untuk menstabilkan fluktuasi sinyal fluoresensi akibat variasi volume, gelembung udara, atau konsentrasi komponen dalam sumur reaksi. Hal ini penting untuk normalisasi data fluoresensi sehingga hasil kuantifikasi menjadi lebih akurat. *Assay mix* pada umumnya berisi primer, probe berlabel FAM atau fluorofor lain, serta buffer spesifik, sementara master mix berisi DNA polimerase, dNTP, buffer, dan ROX sebagai *dye referensi* (Dorak, 2006). Komposisi ini memungkinkan deteksi amplifikasi target dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Kombinasi FAM dalam *assay mix* dan ROX dalam *master mix* telah menjadi standar dalam banyak protokol qPCR komersial (Taylor et al., 2010).

2.4 Preparasi Media Pengayaan

2.4.1 Media *Buffered Peptone Water* (BPW)

Bahan yang digunakan untuk perkembangbiakan bakteri adalah media *Buffered Peptone Water* (BPW). Media BPW merupakan media pengayaan bakteri yang dirancang untuk membantu pemulihan bakteri *Salmonella* sp. yang rusak sebelum dipindahkan ke media selektif. Media BPW mengandung pepton proteosa yang merupakan sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral. Natrium klorida yang ada akan menjaga keseimbangan osmotik dan menjadi media penyangga fosfat. Media BPW menghasilkan tingkat resusitasi yang tinggi bagi bakteri yang terluka dan mendukung pertumbuhan yang *intens* (Baylis et al., 2000).