

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Susu

Susu adalah cairan berwarna putih pekat sebagai hasil dari sekresi kelenjar mammae atau kelenjar susu hewan mamalia. Susu merupakan hasil utama pada usaha budidaya ternak perah dan digunakan untuk bahan makanan serta sumber gizi (Deptan RI, 1983). Menurut Adam and Moss (2008), susu adalah cairan, tidak termasuk kolostrum, disekresikan oleh mamalia yang bertujuan untuk memberi nutrisi pada anak mereka. Kolostrum adalah suatu cairan yang lebih kental, memiliki kandungan lebih dari 25% bahan padat, yang sebagian besar berupa protein, disekresikan setelah proses kelahiran (Adam and Moss, 2008).

Menurut SNI 01-3141 (1998), mendefinisikan bahwa susu-susu murni adalah cairan yang berasal dari ambing sapi sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar dan kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun, sedangkan untuk susu segar adalah susu murni yang tidak mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan tanpa mempengaruhi kemurniannya (BSN, 1998).

Susu termasuk dalam bahan pangan yang kaya akan zat gizi karena memiliki kandungan nutrisi lengkap. Susu memiliki beberapa komponen, yaitu air, lemak, protein dan laktosa (Adam and Moss, 2008). Menurut Purnomo dan Adiono (1997) dalam Frismana (2014) menyebutkan bahwa pada umumnya komposisi susu normal mengandung air sebesar sebesar 87,6 % dan bahan kering 12,4 % yang terdiri dari protein 3,3 %, lemak 3,8 %, karbohidrat 4,7 %, dan

vitamin serta mineral 0,7 %. Komposisi susu tersebut diikuti dengan bahan-bahan lain dalam jumlah sedikit seperti sitrat, enzim, fosfolipid, vitamin A, vitamin B dan vitamin C (Buckle *et al.*, 1987). Komposisi tersebut pada setiap spesies mamalia bervariasi. Perbedaan komposisi penyusun susu antar individu dalam satu strain yang sama, dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti periode laktasi, jarak pemerahan, kondisi pakan dan nutrisi, serta kesehatan pada sapi (Adam and Moss, 2008).

Lemak dalam susu secara umum disusun oleh trigliserida sebesar 98-99 % dari total lemak pada susu. Trigliserida tersebut mengikat berbagai jenis asam lemak. Komponen asam lemak pada susu memiliki panjang rantai karbon yang bervariasi, antara 4 hingga 18 rantai karbon. Jenis lemak lain yang terdapat dalam susu adalah fosfolipida, kolesterol, asam lemak esensial, monogliserida dan digliserida. Kandungan lemak yang relatif tinggi menyebabkan terbentuknya *off-flavor* yang sangat tinggi. Lemak susu juga mengandung vitamin, terutama vitamin A, D, dan sedikit vitamin E (Walstra *et al.*, 2006).

Meirawan (2012) menyatakan bahwa lemak susu yang utama berupa asam lemak, sedangkan pada susu segar biasanya dalam bentuk globula lemak yang dikelilingi oleh lapisan yang kaya akan fosfolipida disebut membran globula lemak. Membran tersebut dapat mencegah penggabungan globula lemak yang akan membentuk butiran yang lebih besar. Globula lemak pada dasarnya memiliki permukaan yang luas, sehingga menyebabkan susu mudah dengan cepat menyerap keadaan disekitarnya (Buckle *et al.*, 1987).

Protein susu dibagi menjadi dua kelompok utama yaitu kasein dan protein *whey*. Pada umumnya protein pada susu sebagian besar adalah kasein (sekitar 80 %), yang tersusun atas α , β , γ dan κ -casein (Walstra *et al.*, 2006). Kasein bersama dengan kalsium fosfat akan membentuk partikel koloidal yang disebut dengan *micelles* (Adam and Moss, 2008). Kasein *micelles* memiliki peranan yang sangat penting dalam menentukan karakteristik susu, terutama sifat koloidalnya. Kasein *micelles* tersusun atas air, protein, garam (kalsium fosfat, kalium, magnesium, dan natrium), *proteose peptone* dan beberapa jenis enzim (Walstra *et al.*, 2006). Protein lain yang terdapat pada susu adalah protein *whey* atau disebut juga sebagai serum protein yang mengandung β -laktoglobulin, α -laktalbumin, albumin serum sapi dan imunoglobulin (Singh and Flanagan, 2006).

2.1.1. Kualitas susu

Susu digunakan oleh masyarakat sebagai bahan pangan untuk memenuhi kebutuhan gizi, sehingga jaminan kualitas terhadap susu harus lebih diperhatikan. Kualitas susu yang baik ditentukan mulai dari proses pemerahan sapi sampai dengan pengolahan susu yang pada akhirnya menjadi produk siap dikonsumsi. Ketentuan kualitas susu yang baik memiliki berat jenis minimum 1,0280 dengan suhu 27,5°C (BSN, 1998). Susu memiliki kandungan air yang sangat tinggi, dengan tingkat keasaman yang relatif netral (pH 6,4 – 6,6) dan kaya akan nutrisi, sehingga dapat digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba (Adam and Moss, 2008). Menurut SNI 7388:2009 tentang persyaratan jumlah total bakteri yang diperbolehkan ada didalam susu segar adalah 1×10^6 koloni/ml (BSN, 2009). Batas maksimum cemaran mikroba pada susu segar pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Batas Maksimum Cemaran Mikroba pada Susu Segar. Sumber BSN (2009)

No	Jenis Cemaran Mikroba	Batas Maksimum Cemaran Mikroba
1	TPC (30°C, 72 jam)	1×10^6 koloni/ml
2	<i>Coliform</i>	2×10^1 koloni/ml
3	MPN <i>Escherichia coli</i>	< 3/ml
4	<i>Salmonella sp.</i>	negatif/25ml
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^2 koloni/ml

Keterangan: TPC: *Total Plate Count*, MPN: *Most Probable Number*.

Tumbuhnya mikroba pada susu dapat menyebabkan penurunan kualitas susu. Terdapat tiga sumber yang berperan dalam keberadaan mikroorganisme pada susu yaitu bagian dalam ambing, bagian luar dan sekeliling puting, dan proses serta peralatan pemerahan (Meirawan, 2012). Salah satu potensi bahaya yang terdapat dalam susu dan berbagai produk olahannya adalah bahaya mikrobiologis (*microbiological hazards*), khususnya keberadaan mikroba patogen. Mikroba patogen dapat mengakibatkan kerusakan susu dan lebih lanjut berakibat pada munculnya penyakit yang terbawa oleh susu (*milkborne diseases*). Pertumbuhan mikroba dalam susu dapat menurunkan mutu dan keamanan pangan susu, yang ditandai oleh perubahan rasa, aroma, warna, konsistensi, dan tampilan (Handayani dan Purwanti, 2010).

Kondisi kesehatan sapi sangat berpengaruh terhadap kualitas susu yang dihasilkan, sapi yang sehat tentunya akan menghasilkan kualitas susu yang baik, berbeda halnya dengan sapi yang tidak sehat. Susu sapi yang berasal dari sapi

yang sehat dapat juga tercemar mikroba setelah diperah (Handayani dan Purwanti, 2010). Sapi yang tidak sehat dan tidak bersih pada waktu diperah akan menghasilkan susu yang memiliki kandungan bakteri dalam jumlah banyak. (Frismana, 2014). Menurut Fardiaz (1993), bakteri patogen yang dapat ditemukan dalam susu segar diantaranya adalah *Coliform*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ketiga bakteri tersebut penyebab timbulnya diare pada manusia dan hewan jika dikonsumsi.

Proses penyimpanan susu segar juga berpengaruh terhadap jumlah mikroba pada susu Sudono dkk., (2003) menyebutkan bahwa suhu penyimpanan yang baik untuk susu adalah pada suhu 4°C agar lebih tahan lama dibandingkan pada suhu lebih dari 4°C yang menyebabkan bakteri mudah berkembang biak.

2.1.2. Kontaminasi pada susu

Kontaminasi adalah bahan yang tidak dikehendaki ada dalam makanan yang mungkin berasal dari lingkungan atau sebagai akibat dari proses produksi makanan, dapat berupa cemaran biologis, kimia dan benda asing yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia (BPOM RI, 2009). Volk and Wheeler (1990) menyatakan bahwa kontaminasi pada susu berasal dari sapi, peralatan pemerahan, ruang penyimpanan yang kurang bersih, debu, udara, lalat dan penanganan oleh manusia. Susu yang tercemar oleh kotoran mengakibatkan susu mudah rusak, maka sapi yang hendak diperah harus bersih, untuk itu sapi perlu dibersihkan dari kotoran yang melekat pada tubuhnya, mulai dari ekor, ambing hingga puting.

Pada saat pemerah susu, terutama pemerah harus menjaga kebersihan pakaian dan badannya, harus sehat dan tidak mempunyai luka serta mempunyai pengetahuan tentang hygiene dan sanitasi untuk mencegah terjadinya kontaminasi selama pemerahan. Kontaminasi pada susu sering juga disebabkan karena peralatan pada waktu pemerahan, wadah susu, dan air pencuci alat yang kondisinya kotor atau tidak terjaga kebersihannya. Alat-alat untuk pemerah yang digunakan harus bersih dan steril. Jika dalam alat pemerah terdapat residu susu, ini akan menyebabkan pertumbuhan bakteri pada peralatan (Frismana, 2014).

Kandang bagi sapi bukan hanya berfungsi sebagai tempat tinggal, akan tetapi juga dapat memberikan perlindungan dari segala aspek. Kandang sapi memiliki syarat tertentu yang bertujuan untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi, antara lain: adanya ventilasi atau perputaran udara yang sempurna, mudah dibersihkan dan selalu terjaga dengan baik kebersihannya, lantai tidak licin, lantai miring dan terdapat penampungan kotoran (Siregar, 1995).

2.1.3. Manajemen pemerahan

Pemerahan adalah tindakan mengeluarkan susu dari ambing yang bertujuan untuk mendapatkan produksi susu yang maksimal. Kualitas hasil pemerahan tergantung pada tatalaksana pemeliharaan dan pemerahan yang dilakukan. Meirawan (2012) menyatakan bahwa prosedur dan tata laksana pemerahan yang baik, khususnya pada aspek sanitasi dan higienitas proses pemerahan, memberikan peningkatan kualitas susu, terutama pada aspek kontaminasi bakteri. Sebelum melakukan pemerahan sebaiknya membersihkan feses dan urin dari lantai kandang agar tidak mengkontaminasi pada saat proses

pemerahan berlangsung, melakukan pencucian pada ambing dengan air hangat secara satu per satu, membersihkan alat-alat pemerahan dan menjaga kebersihan tempat penampung susu selama masa pemerahan. Menurut Siregar (1995), sapi yang akan diperah harus sudah bersih terutama ambing dan sekitarnya serta diupayakan sapi tersebut terhindar dari lalat yang dapat menimbulkan gangguan pada waktu pemerahan.

Selesai pemerahan puting segera dicelupkan pada larutan desinfektan (*dipping*) untuk mencegah terjadinya mastitis, mencegah masuknya bakteri dan hinggapan lalat (Sudono dkk., 2003). Semua peralatan yang telah digunakan dilakukan pembersihan kembali dengan air bersih dan disimpan pada tempat yang aman, kering dan bersih (Siregar, 1995).

Susu segar yang dihasilkan harus segera ditangani dengan cepat dan benar. Hal ini disebabkan sifat susu yang mudah rusak dan mudah terkontaminasi. Peralatan yang digunakan untuk menampung susu harus dalam keadaan bersih, sebelum dimasukkan ke dalam *milk can*, susu harus disaring terlebih dahulu agar bulu sapi dan vaselin yang tercampur dengan susu tidak terbawa masuk ke dalam *milk can* (Sudono dkk., 2003).

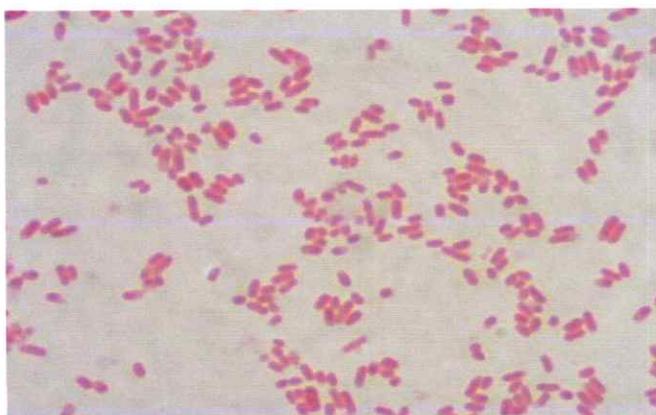
2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli dikenal dengan nama enterobakteria dan diklasifikasikan dalam famili *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* memiliki nama lain yaitu *Bacillus coli* atau *Bacterium coli* atau *Colon bacillus* (Iman dkk., 2011). Bakteri ini pertama kali diidentifikasi oleh Theodor Escherich dalam studinya mengenai sistem pencernaan pada bayi hewan, digambarkan sebagai komunitas

bakteri coli yang terbangun dengan segala perlengkapan patogenitasnya untuk menginfeksi saluran pencernaan. Holt *et al.*, (2000) menjelaskan taksonomi *Escherichia coli*, sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Filum	: Thallophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Eubacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Morfologi *Escherichia coli* berbentuk batang pendek, berukuran 0,5 x 1,0 – 3,0 μ , termasuk Gram negatif, tidak membentuk spora dan dapat dijumpai dalam bentuk yang bervariasi yaitu bentuk kokoid bipolar hingga filament panjang (Iman dkk., 2011). Kedudukan sel bakteri satu sama lain pada umumnya terletak sendiri-sendiri, tetapi dapat pula ditemukan berpasangan menyerupai rantai pendek yang sebagian besar merupakan bakteri motil karena memiliki flagella dan ada terdapat pula yang tidak motil. Beberapa galur bakteri ini memiliki kapsul, tetapi pada umumnya kebanyakan tidak berkapsul (Holt *et al.*, 2000). Bakteri ini mempunyai fili atau *fimbriae* yang berfungsi sebagai alat perlekatan dengan bakteri lain (Gambar 2.1.) menjelaskan bentuk dari *Escherichia coli*.



Gambar 2.1. Pewarnaan Gram *Escherichia coli* dengan perbesaran 400x. Berbentuk batang lurus secara tunggal atau berpasangan. Ukuran sel berkisar 1-1,5 μm pada lebar dan 2-6 μm pada panjang. (Sumber: Leboffe and Pierce, 2011).

Escherichia coli dalam kondisi alaminya dapat bertahan beberapa minggu sampai beberapa bulan di dalam air, feses, dan sampah, tetapi tidak tahan terhadap kondisi kering dan terhadap desinfektan. Beberapa strain *Escherichia coli* juga ditemukan terdapat pada temperatur dingin dibawah 0°C atau pada keadaan beku selama 6 bulan. Bakteri ini biasanya mati pada temperatur 60°C selama 30 menit, tetapi ada beberapa strain yang resisten (Iman dkk., 2011).

2.2.1. Sifat pupukan *Escherichia coli*

Escherichia coli bersifat aerobik dan fakultatif anaerobik. Suhu yang baik dalam pertumbuhan *Escherichia coli* berkisar antara $15-45^{\circ}\text{C}$ dengan suhu optimum untuk pertumbuhan adalah $37,5^{\circ}\text{C}$. Bakteri ini pada umumnya memiliki pH optimum pertumbuhan antara 6,5 hingga 7,5 (Pelczar and Chan, 1986). Frazier and Westhoff (1988) menyatakan bahwa bakteri ini memiliki pH minimum 4 dan pH maksimum 8,5. *Escherichia coli* tumbuh baik pada pH 7 dan pada media biasa (Iman dkk., 2011).

Escherichia coli mudah ditumbuhkan pada berbagai media perbenihan. Iman dkk., (2011) menyebutkan pada Nutrient Agar, koloni dapat berwarna putih kekuningan, atau kuning keemasan sesuai dengan umur pupukan, basah, mengkilat, lembut dan bulat dengan sisi rata. Media Agar Darah dapat digunakan pula sebagai media umum, bakteri ini akan membentuk koloni bulat, licin, tidak berwarna, tepi rata dan konsistensi seperti mentega. *Escherichia coli* yang memproduksi α -hemolisin akan membentuk zona terang di sekitar koloni, β -hemolisin akan terlihat zona agak gelap di sekitar koloni dan kuman yang memproduksi kombinasi α dan β -hemolisin akan tampak zona gelap dan terang di sekitar koloni (Pelczar and Chan, 1988).

Media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) sering digunakan dalam media padat, menjadi salah satu dasar dalam identifikasi koloni *Escherichia coli*. Media ini digolongkan sebagai media selektif. Media selektif adalah media yang dapat menumbuhkan satu atau beberapa koloni bakteri serta menghambat pertumbuhan koloni bakteri lainnya. Pada media EMBA akan ditemukannya koloni yang berwarna hijau metalik dengan pusat koloni berwarna hitam (Iman dkk., 2011). Gambaran sifat koloni *Escherichia coli* terdapat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. *Escherichia coli* pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) (Sumber: Lal and Cheeptham, 2007).

2.2.2. Sifat biokimia *Escherichia coli*

Escherichia coli sebagian besar tumbuh sebagai koloni yang dapat memfermentasi laktosa. Fermentasi laktosa menyebabkan koloni pada EMBA akan berwarna gelap. Laktosa dan zat pewarna eosin serta metilen biru mampu membedakan antara bakteri yang memfermentasi laktosa dengan non-fermenter, sehingga koloni *Escherichia coli* tersebut kelihatan biru kehitaman dengan kilat hijau logam atau metalik yang disebabkan besarnya kuantitas asam yang dihasilkan dan pengendapan zat pewarna di atas permukaan pertumbuhan (Mansauda dkk., 2014). Bakteri ini membentuk asam dan gas dari glukosa, laktosa, fruktosa, galaktosa, arabinosa, xylosa, ramnosa dan manitol (Iman dkk., 2011). Pelczar dan Chan (1986) menyebutkan bahwa *Escherichia coli* dapat merombak karbohidrat dan asam-asam lemak.

Uji yang dilakukan untuk mengetahui jenis koliform disebut dengan uji IMViC. Reaksi-reaksi yang terjadi pada uji IMViC tersebut adalah Uji indol, Uji Methyl Red, Uji Voges-Proskauer dan Uji Sitrat. *Escherichia coli* menunjukkan

reaksi positif pada Uji Methyl Red menjadi warna merah pada permukaan serta di ikuti Uji Voges-Preskauer negatif, memproduksi katalase sehingga positif, tidak mencerna atau mencairkan gelatin, membentuk indol positif, mereduksi nitrat, mengkoagulasikan serta mengasamkan susu tanpa peptonisasi, mengoksidasi kentang menjadi warna coklat tua dan tidak membentuk H₂S (Iman dkk., 2011).

Pada Uji Indol *Escherichia coli* mampu membentuk indol dari triptofan yang ditunjukkan dengan timbulnya warna merah. Bakteri ini memiliki enzim tryptophanase yang dapat menghidrolisis triptofan menjadi piruvat, amonia, dan indol (Leboffe and Pierce, 2011). Triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh bakteri. Pada umumnya asam amino digunakan sebagai komponen sel dan sumber energi. Indol yang terbentuk akan berwarna merah dengan penambahan reagen Kovach atau Erlich yang mengandung amil alkohol, sehingga dapat dikatakan positif apabila senyawa ini menghasilkan warna merah pada permukaan medium (Azizah, 2012).

Pada Uji Methyl Red digunakan untuk menentukan adanya fermentasi campuran asam. Menurut Sarudji dkk., (2011) beberapa bakteri memfermentasi glukosa menjadi asam tanpa adanya reaksi yang lebih lanjut. Uji ini dilakukan untuk menghasilkan suatu asam melalui proses hidrolisis yang menghasilkan asam organik sederhana. Penambahan indikator Methyl Red pada akhir pengamatan dapat menunjukkan perubahan pH menjadi asam, sehingga Methyl Red akan menjadi merah pada suasana asam (pada lingkungan dengan pH 4,4) dan akan berwarna kuning pada suasana basa (pada suasana lebih dari atau sama

dengan 6,2) (Azizah, 2012). *Escherichia coli* memiliki reaksi positif pada uji ini karena bakteri ini mampu menurunkan pH medium yang mengandung 0,5 % glukosa sehingga mencapai pH 5,0.

Uji Voges-Proskauer bertujuan untuk membedakan antara organisme yang menghasilkan asam dalam jumlah yang besar dan yang menghasilkan asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil metabolisme glukosa. Uji ini dirancang khusus untuk bakteri yang mampu memfermentasi glukosa, tetapi dapat juga untuk mengubah dengan cepat terbentuknya produk asam asetoin dan 2,3 butanadiol (Leboffe and Pierce, 2011). Senyawa ini tidak terbentuk oleh *Escherichia coli*, sehingga menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna. Pada uji Voges-Proskauer ini dilakukan penambahan 40% KOH dan 5% larutan alfa naftol untuk dapat menentukan adanya asetoin, suatu senyawa dalam sintesis 2,3 butanadiol (Azizah, 2012).

Uji sitrat merupakan salah satu pengujian untuk identifikasi bakteri golongan Enterobacteriaceae dan termasuk dalam kelompok uji IMViC. Pada umumnya uji sitrat digunakan untuk menentukan kemampuan suatu bakteri untuk menggunakan sitrat sebagai karbon utama (Sarudji, 2011). *Escherichia coli* tidak menggunakan sitrat ini sebagai sumber karbon, sehingga reaksi yang tampak pada uji ini adalah negatif.

2.2.3. Patogenitas *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri enterik yang bersifat sebagai bakteri normal di dalam usus pada manusia maupun hewan. Karsinah dkk (1994) menyatakan bahwa pada keadaan-keadaan di mana terjadi perubahan pada inang

atau bila ada kesempatan memasuki bagian tubuh yang lain, bakteri ini mampu menimbulkan penyakit. *Escherichia coli* juga dapat menjadi patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat. Bakteri ini di dalam saluran pencernaan menghasilkan enterotoksin yang dapat meningkatkan sekresi cairan dan elektrolit ke dalam lumen usus, hal inilah yang menyebabkan diare (Subronto, 1985). Mekanisme patogenisitas strain ini melibatkan proses penempelan dan kolonisasi pada saluran pencernaan dan produksi toksin.

Kemampuan suatu organisme untuk menyebabkan penyakit disebut patogenisitas, sedangkan virulensi mengacu pada tingkat keparahan dari suatu patogenisitas. Menurut Wistreich (2000) bahwa virulensi tergantung dari organisme tertentu termasuk kemampuannya dalam menginfeksi tubuh. Berdasarkan perbedaan serotipe dan virulensi, *Escherichia coli* patogen yang menyebabkan penyakit pada saluran pencernaan dikelompokkan dalam 5 kategori yaitu: *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) dan *Enterotoxigenic Escherichia coli* (EAEC).

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adalah penyebab penting diare di Negara berkembang terutama pada anak-anak. Faktor virulensi EPEC akan melekat pada mukosa usus dan merusak vili-vili usus. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang pada umumnya dapat sembuh dengan sendirinya tetapi dapat juga menjadi kronik. Lamanya diare EPEC dapat diperpendek dan diare kronik dapat diobati dengan pemberian antibiotik (Jawetz *et al.*, 1995).

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) adalah penyebab yang sering terjadi dari 'diare wisatawan'. Faktor virulensi dari ETEC disebabkan adanya ekspresi antigen fimbria sehingga memungkinkan *Escherichia coli* menempel pada sel usus dan memproduksi enterotoksin (Widyastika, 2008).

Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) adalah penyebab dari diare ringan sampai adanya nyeri abdomen berat dengan colitis hemoragik. Radostits *et al.* (2000) menyebutkan bahwa EHEC jarang menyebabkan penyakit hewan ternak yang baru lahir dan melekat pada usus besar dan usus kecil. Faktor virulensi dari EHEC adalah membentuk koloni pada saluran pencernaan sehingga mengakibatkan terjadinya atrofi dari mikrofilia sel-sel epitel usus. EHEC termasuk dalam *food borne* dan *water borne disease* (Widyastika, 2008).

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) adalah penyebab diare yang sering terjadi pada anak-anak dan sangat mirip dengan diare shigellosis berupa diare berair. Faktor virulensi dari EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus (Jawetz *et al.*, 1995).

Enteraggregative Escherichia coli (EAEC) telah ditemukan di beberapa negara di dunia. EAEC adalah penyebab diare pada anak-anak yang berupa diare berlendir. EAEC juga menyebabkan diare akut dan kronik (Jawetz *et al.*, 1995). Mekanisme terjadinya diare yang disebabkan oleh EAEC belum jelas diketahui, tetapi diperkirakan menghasilkan sitotoksin yang menyebabkan terjadinya diare. Faktor virulensi dari EAEC adalah menempel pada sel usus mamalia (Widyastika, 2008).

2.2.4. Transmisi *Escherichia coli* pada manusia

Escherichia coli selain flora normal pada usus manusia dan hewan terutama kolon, bakteri ini dapat ditemukan pada tanah, air dan debu. Bakteri tersebut mampu menginfeksi melalui bahan makan seperti susu dan daging. Pemerahan susu yang tidak sesuai dengan aturan yang benar dapat menyebabkan tercemarnya susu oleh mikroorganisme dari lingkungan sekitarnya sehingga menyebabkan kualitas susu menurun dan pencemaran daging oleh mikroba dapat terjadi sebelum dan setelah hewan dipotong (Gustiani, 2009). *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi apabila manusia mengkonsumsi susu dan daging yang telah terkontaminasi oleh bakteri tersebut dan tidak dimasak secara sempurna. Bakteri masuk ke dalam saluran pencernaan manusia melalui makanan, yang kemudian dicerna dan diserap oleh tubuh. Dalam kondisi yang sesuai, mikroba patogen akan berkembang biak di dalam saluran pencernaan sehingga menyebabkan gejala penyakit (Gustiani, 2009).

2.3. Antibiotika

Antibiotika adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh berbagai jasad renik atau mikroorganisme yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme lain. Antibiotik memiliki khasiat dalam mengobati berbagai penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang memiliki sifat toksisitas selektif artinya antibiotik tersebut bersifat sangat toksik terhadap bakteri, tetapi tidak toksik untuk hospes. Antibiotika dibedakan dalam beberapa golongan yaitu antibiotika beta laktam (penisilin, sefalosporin, monobaktam dan karbapenem), tetrasiklin, kloramfenikol, makrolida, linkomisin, aminoglikosida, antibiotika

polipeptida dan fosfomisin (Mutschler, 1991). Menurut Subronto dan Tjahajati (2008) menyatakan bahwa klasifikasi antibiotika berdasarkan atas cara kerja dari antibiotika, sifat bakteri yang peka dan kemampuan antibiotika terhadap bakteri dan pertumbuhannya.

Obat antibiotika mempunyai beberapa mekanisme kerja yaitu ada yang dapat menghambat sintesis dinding sel yang memiliki efek pada pemecahan enzim dinding sel dan ada yang melakukan penghambatan enzim dalam sintesis dinding sel, yaitu yang dikenal kelompok antibiotik beta laktam, seperti penisilin, sefalosporin dan karbapenam. Selain antibiotik beta laktam yang mekanisme kerjanya menghambat sintesis dinding sel bakteri seperti basitrasin dan vankomisin. Terdapat mekanisme kerja obat lainnya yaitu dengan melakukan perubahan permeabilitas membran untuk meningkatkan permeabilitas membrannya, sehingga dengan hilangnya substansi selularnya menyebabkan sel menjadi lisis. Kelompok antibiotik yang memiliki mekanisme ini antara lain polimiksin dan kolistin. Antibiotika dapat juga memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat sintesis protein yang mengganggu sintesis protein tanpa mempengaruhi sel-sel normal, seperti aminoglikosida, tetrasiklin, eritromisin dan linkomisin. Selain itu terdapat juga antibiotika yang mengganggu metabolisme seluler bakteri pada tahapan metabolismenya di dalam sel, yaitu kelompok antibiotik sulfonamida, trimetoprim dan rifampin (Kee and Hayes, 1996).

Menurut Mutschler (1991) bahwa sifat kuman yang peka terhadap antibiotika bervariasi tergantung pada masing-masing senyawa. Terdapat antibiotika yang mempunyai spektrum luas terhadap mikroba Gram positif dan

negatif, terdapat juga yang hanya bekerja terhadap Gram positif atau Gram negatif saja. Berdasarkan kemampuan antibiotika terhadap bakteri dan pertumbuhannya dibedakan menjadi dua, yaitu bakterisidal dan bakteriostatik. Bakterisidal adalah bahan yang dapat membunuh bakteri. Sedangkan bakteriostatik adalah bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Meirawan, 2012).

2.4. Tetrasiklin

Tetrasiklin pertama kali ditemukan oleh Lloyd Conover, yang pada awalnya diproduksi oleh *Streptomyces aureofaciens* (klortetrasiklin) pada tahun 1948 dan pada tahun 1950 diproduksi oleh *Streptomyces rimosus* (oksitetrasiklin) (Tan dan Rahardja, 2002). Tetrasiklin merupakan antibiotika yang bersifat bakteriostatik dan berspektrum luas yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram Positif serta Gram Negatif (Jawetz *et al.*, 1995). Menurut Mutschler (1991) bahwa tetrasiklin bekerja baik pada mikroba ekstrasel maupun intrasel. Antibiotika ini yang umum digunakan dokter hewan sebagai obat-obatan yang dapat dicampurkan ke dalam pakan (Pieshesa, 2011).

Tetrasiklin adalah salah satu antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein pada perkembangan organisme (Tan dan Rahardja, 2002). Mekanisme kerja tetrasiklin terhadap bakteri yaitu tetrasiklin terikat pada sub unit 30S dari ribosom bakteri. Tetrasiklin menghambat sintesis protein dengan penambahan asam amino baru pada rantai peptida yang sedang terbentuk (Jawetz *et al.*, 1995). Mekanisme kerja dalam menghambat, yaitu dengan menghambat pemasukan aminoasil-tRNA pada fase pemanjangan yang termasuk fase translasi sehingga dapat menyebabkan blokade perpanjangan rantai peptida (Mutschler, 1991).

Menurut Chambers (2007) yang menyatakan bahwa terjadi pemblokiran pada ikatan antara aminoasil-tRNA dengan reseptor mRNA, sehingga terjadi proses penghambatan pada pembentukan asam amino menjadi peptida.

Mutschler (1991) menyatakan bahwa tetrasiklin memiliki sedikit toksisitas yang disebabkan oleh afinitas ribosom bakteri lebih besar daripada afinitas pada ribosom mamalia. Tetrasiklin sering digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit infeksi, misalnya metritis, pneumonia, mastitis, enteritis, shipping fever dan anthrax pada hewan besar. Pemberian tetrasiklin dapat secara intrauterin dalam bentuk bolus dan intramame dalam bentuk pasta (Subronto dan Tjahajati, 2008).

Terdapat tiga cara kerja yang diindikasikan sebagai resistensi bakteri terhadap tetrasiklin, pertama adalah adanya ketidakseimbangan secara aktif proses transport pompa protein pada *influx* ataupun pada peningkatan *efflux*, kedua adalah adanya proteksi organel ribosom karena produksi protein dapat mempengaruhi ikatan antara tetrasiklin dengan ribosom, ketiga adanya inaktivasi karena pengaruh enzim (*enzimatic inactivation*) (Chambers, 2007).

Kejadian dari resistensi bakteri terhadap tetrasiklin menunjukkan adanya proteksi organel ribosom dan produksi pompa *efflux* merupakan hal paling penting yang perlu diperhatikan (Chambers, 2007). Seperti halnya jika suatu obat antibakteri telah berhasil melewati membran sel, dan obat tersebut selanjutnya dapat dieliminasi oleh *efflux pump* bakteri yang aktif. Bakteri akan mengembangkan pompa *efflux* secara aktif untuk mengeluarkan antibiotik dari sitoplasmanya lebih cepat dari pada kecepatan obat tersebut masuk untuk

berdifusi, sehingga konsentrasi obat didalam bakteri menjadi terlalu rendah dan menjadi tidak efektif. Pada *Escherichia coli* protein *efflux* dikodekan oleh gen yang dikenal dengan gen *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* dan *tetY* (Chopra and Roberts, 2001). Beberapa peneliti mendeteksi bahwa gen *tetA* lebih banyak ditemukan dari pada *tetB* yang memiliki ukuran *base pair* yang sama yaitu 178 bp (Pyatov *et al.*, 2014).

2.5. Sulfonamida

Sulfonamida pertama kali diisolasi dari senyawa tar batubara pada awal tahun 1900 dan kemudian diproduksi untuk pemakaian dalam klinik untuk mengatasi infeksi kokus pada tahun 1935. Oleh sebab itu sulfonamida merupakan kelompok obat pertama yang dipakai untuk melawan bakteri (Kee and Hayes, 1996). Sulfonamida sendiri mempunyai sifat bakterostatik terhadap beberapa bakteri Gram Negatif dan Gram Positif, sehingga sulfonamida dapat dikategorikan masuk dalam kelas yang berspektrum luas (Jones, 1965).

Sulfonamida memiliki mekanisme kerja terhadap infeksi bakteri adalah dengan mengganggu metabolisme seluler (Kee and Hayes, 1996). Antimikroba ini dapat memasuki reaksi sebagai pengganti PABA dan bersaing untuk pusat aktif enzim. Akibatnya, terbentuklah analog asam fosfat yang tidak berfungsi, yang mencegah pertumbuhan sel bakteri lebih lanjut. Daya hambat sulfonamida pada pertumbuhan bakteri dapat dilawan oleh PABA yang berlebihan pada lingkungan (hambatan karena persaingan) (Jawetz, 1995).

Sulfonamida merupakan penghambat reaksi pada jalur metabolisme yang memproduksi asam tetrahidrofolat, yang merupakan kofaktor esensial dalam

sintesis asam nukleat (Pratiwi, 2008). Subronto dan Tjahajati (2008) menjelaskan bahwa dalam keadaan normal kuman memerlukan asam dihidrofolat yang berasal dari asam para amino benzoat (PABA) dan dihidropteridin, sehingga terbentuk dihidropteroat sedangkan dengan asam glutamat akan terbentuk asam dihidrofolat. Selanjutnya dengan direduksi akan terbentuk asam tetrahidrofolat, merupakan senyawa yang digunakan oleh kuman untuk sintesis asam thimidilat, purin, histidin dan methionin. Adanya sulfonamida akan terjadi kompetisi dengan PABA, oleh sebab itu dari keempat asam amino tersebut tidak terbentuk sehingga kuman akan mati karena tidak dapat melangsungkan metabolisme.

Apabila suatu organisme yang resisten terhadap salah satu dari sulfonamida, maka secara umum organisme tersebut akan tahan terhadap semua sulfonamida lainnya. Pusat mekanisme biokimia resistensi sulfonamida membicarakan tentang kemampuan organisme mensintesis bahan kimia yang diperlukan untuk pertumbuhan. Beberapa bakteri yang resisten terhadap sulfonamida, misalnya, mensintesis asam para amino benzoat dalam jumlah besar, saat sensititas sulfonamida tidak bekerja terhadap organisme. Sintesis PABA membuat organisme yang resisten dimaksudkan untuk dapat mengaktivasi sulfonamida, sehingga organisme tersebut akan memerlukan blok bangunan untuk memproduksi asam folat dan purin yang penting untuk pertumbuhan dan reproduksinya (Jones, 1965).

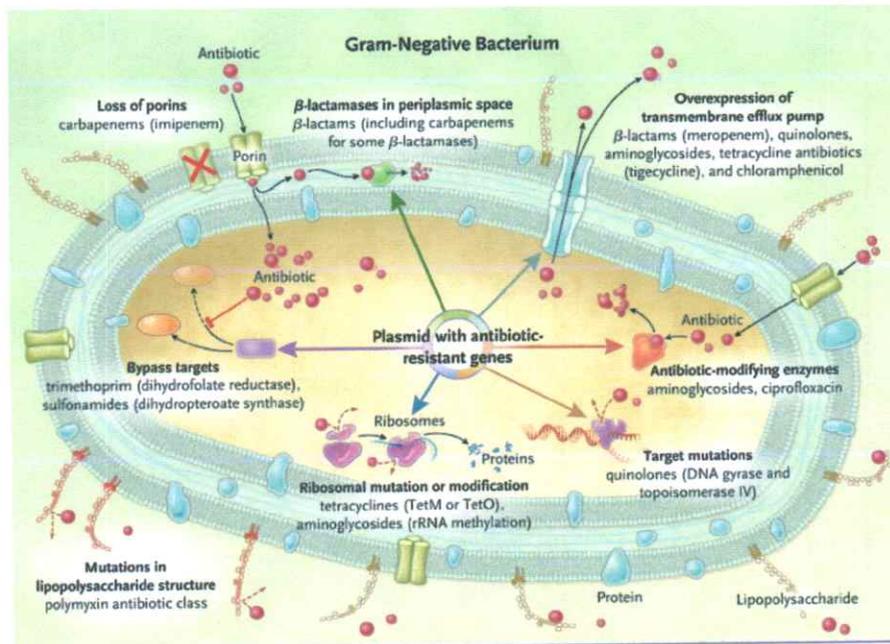
Sulfonamida bersaing dengan struktur analog asam para amino benzoat untuk mengikat dihidropteroat synthase yaitu enzim katalitik dalam asam folat jalur biosintesis, sehingga dapat menghambat pembentukan asam dihidrofolat.

Resistensi terhadap sulfonamida pada *Escherichia coli* dapat terjadi adanya mutasi pada gen pengkode enzim yang terlibat dalam jalur metabolisme sintesis asam tetrahidrofolat. Enzim berubah berfungsi secara normal namun tidak dihambat oleh sulfonamida (Pratiwi, 2008). Mutasi atau lebih sering dari akuisisi gen dihidropteroat synthase yang dikenal dengan *sul*, yang memiliki produk afinitas yang lebih rendah untuk sulfonamida (Perreten and Boerlin, 2003). Resistensi *Escherichia coli* terhadap sulfonamida dapat dikodekan oleh gen *sull*, *sullI* dan *sullII*. Gen tersebut dilaporkan oleh Pyatov *et al.*, (2014) bahwa dengan ukuran yang sama yaitu 160 bp gen *sull* lebih banyak terdeteksi dari pada *sullI* pada sampel susu. Sedangkan Gen *sullII* jarang ditemukan (Karczmarczyk *et al.*, 2011).

2.6. Resistensi Antibiotika

Resistensi antibiotika pada bakteri *Escherichia coli* memiliki beberapa mekanisme yang digunakan sebagai perlawanan terhadap antibiotika. Mekanisme-mekanisme tersebut merupakan resistensi yang dapat melalui penutupan celah atau pori (*loss of porins*) pada dinding sel bakteri sehingga menurunkan jumlah obat yang melintasi membran sel, peningkatan produksi betalaktamase dalam periplasmik yang dapat merusak struktur betalaktam, peningkatan aktivitas pompa keluaran (*efflux pump*) pada transmembran sehingga bakteri akan membawa obat keluar sebelum memberikan efek, memodifikasi enzim-enzim sehingga antibiotika tidak dapat berinteraksi dengan tempat target, adanya mutasi tempat target yang menghambat bergabungnya antibiotika dengan tempat aksi, modifikasi atau mutasi ribosomal sehingga mencegah bergabungnya antibiotika

yang menghambat sintesis protein bakteri, mekanisme langsung terhadap metabolik (*metabolic bypass mechanism*) yang merupakan enzim alternatif untuk melintasi efek penghambatan antibiotika dan mutasi dalam lipopolisakarida sehingga tidak dapat berikatan dengan targetnya (Peleg and Hooper, 2010). Mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotika terdapat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Mekanisme Resistensi Bakteri Gram Negatif (Sumber: Peleg and Hooper, 2010).

Resistensi terhadap antibiotik pada bakteri secara umum dapat dibedakan menjadi resistensi bawaan (primer), resistensi dapatan (sekunder) dan resistensi episomal. Resistensi bawaan (primer) merupakan resistensi yang menjadi sifat alami bakteri, resistensi dapatan (sekunder) diperoleh akibat kontak dengan agen antibiotik dalam waktu yang cukup lama dengan frekuensi yang tinggi, sehingga memungkinkan terjadinya mutasi pada bakteri dan resistensi episomal disebabkan oleh faktor genetik di luar kromosom (Pratiwi, 2008).

Resistensi terhadap antibiotika pada bakteri yang disebabkan oleh proses mutasi dan seleksi alam dapat juga disebut dengan evolusi vertikal serta perubahan antar strain dan spesies yang disebut dengan evolusi horizontal. Secara genetik, resistensi antibiotik dapat terjadi karena mutasi, baik dalam tingkat kromosom maupun dalam plasmidnya (Quinn *et al.*, 2002). Beberapa bakteri mengembangkan resisten genetik melalui proses mutasi dan seleksi, kemudian memberikan gen kepada beberapa bakteri lain melalui suatu proses untuk perubahan genetik yang ada pada bakteri. Bakteri yang mengalami resisten mendapatkan materi genetik seperti plasmid yang mengandung gen resisten terhadap antibiotik. Mayoritas kasus resistensi terhadap antibiotika terjadi karena adanya transfer gen yang mengkode resistensi dari satu strain bakteri ke strain lainnya (Pratt, 1990).

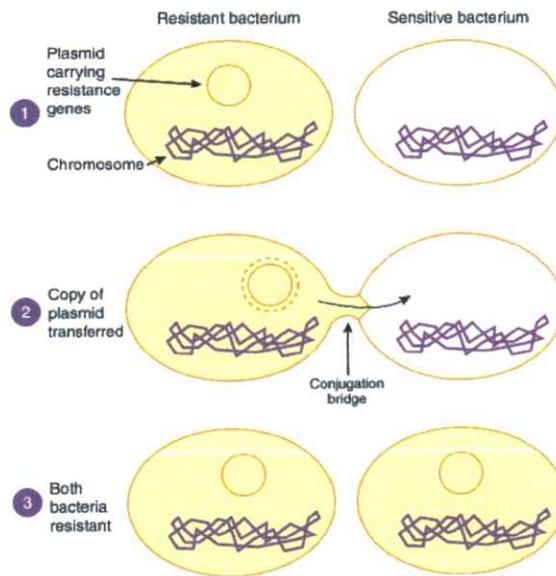
2.7. Transfer Gen

Resistensi *Escherichia coli* dapat disebabkan oleh adanya suatu ekspresi gen yang terjadi karena mekanisme transfer gen. Mekanisme transfer gen pada sel bakteri (sel prokariotik) dapat melalui tiga mekanisme, yaitu konjugasi, transduksi dan transformasi (Jawetz *et al.*, 1995). Ketiga mekanisme tersebut dapat disebut dengan istilah rekombinasi genetik. Rekombinasi genetik terjadi ketika sekuen dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) dari dua individu yang berbeda bergabung menjadi satu. Pada bakteri, rekombinasi tersebut menginduksi sebuah sifat yang tidak diturunkan dari induk, karena adanya materi genetik baru yang berasal dari sel yang berbeda (Quinn *et al.*, 2002).

Konjugasi adalah hubungan fisik antara dua bakteri yang secara langsung DNA akan dipindahkan (ditransfer) dari bakteri satu ke bakteri lainnya (Quinn *et al.*, 2002). Pada proses transfer tersebut, gen pada kromosom dan gen pada plasmid dapat dipindahkan (Golan *et al.*, 2008).

Proses terjadinya konjugasi adalah sel donor akan ikut memberikan energi untuk sintesis untai baru DNA yang secara fisik dipindahkan pada sel penerima. Penerima akan melengkapi struktur DNA untai-ganda dengan mensintesis rantai pasangannya sebagai pelengkap untuk untai yang diperoleh dari donor. Proses pemindahan bahan genetik terjadi selama proses konjugasi antara bakteri dari genus yang sama atau genus yang berlainan (Brooks *et al.*, 2004). Konjugasi dapat terjadi pada beberapa genus bakteri Gram positif dan genus *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Clostridium* dan *Bacillus* (Meirawan, 2012).

Konjugasi merupakan suatu cara alami untuk mentransfer materi genetik antar bakteri yang dilakukan oleh bakteri yang berbeda. Peristiwa pengiriman atau membagi materi genetik tersebut dilakukan dengan menggunakan *Sex filli*. Plasmid mengalami replikasi dan ditransfer menuju bakteri lainnya melalui *sex filli* (Rifa'i, 2010). Proses konjugasi terdapat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Proses konjugasi yang menyebabkan resistensi. (Sumber: Rifa'i, 2010).

Transduksi merupakan suatu bentuk rekombinasi yang disebabkan adanya induksi dari bakteriofage. Proses transduksi adalah pemindahan DNA plasmid atau gen yang terbungkus dalam virus bakteri atau bakteriofage (Golan *et al.*, 2008). Bakteriofage tersebut akan memindahkan DNA plasmid dari satu bakteri ke bakteri yang lain (Brooks *et al.*, 2004).

Proses transduksi terjadi ketika bakteriofage menginfeksi bakteri dan DNA bakteriofage tersebut akan menempel pada plasmid bakteri. Bakteriofage meyisipkan DNANYa secara langsung ke dalam DNA atau plasmid bakteri dengan tujuan agar semua kinerja dan protein yang dihasilkan oleh sel bakteri dapat dikontrol secara langsung untuk membentuk dan merakit bakteriofage. Ketika perakitan bakteriofage selesai, bakteriofage akan keluar dari bakteri dan sel bakteri akan mengalami lisis (Rifa'i, 2010).

Materi genetik yang terdapat dalam kapsid bakteriofage terdiri dari materi genetik bakteri dan bakteriofage. Ketika bakteriofage menginfeksi bakteri lainnya,

akan terjadi penyisipan materi genetik dari bakteriofage ke dalam materi genetik bakteri tersebut. Transduksi ini menyebabkan terjadinya rekombinasi DNA yang terjadi karena vektor dari bakteriofage atau virus dan menyebabkan bakteri memiliki gen yang berasal dari bakteri lainnya (Rifa'i, 2010). Proses transduksi dimana bakteriofage dapat memindahkan semua gen bakteri, tidak secara spesifik, disebut dengan transduksi umum (*generalized transduction*). Selain itu, bakteriofage yang memindahkan gen bakteri yang telah terhubung dengan posisi profage pada bagian kromosom bakteri disebut dengan transduksi terbatas atau khusus (*restricted or specialized transduction*) (Meirawan, 2012).

Mekanisme transfer gen yang terakhir adalah transformasi. Transformasi merupakan pengambilan DNA oleh bakteri dari lingkungan di sekelilingnya. DNA yang berada di sekitar bakteri (DNA asing) dapat berupa potongan DNA atau fragmen DNA yang berasal dari sel bakteri yang lain atau organisme yang lain. Masuknya DNA dari lingkungan ke dalam sel bakteri ini dapat terjadi secara alami (Rifa'i, 2010).

Proses transformasi terjadi ketika bakteri yang menjadi donor mengalami lisis, sehingga segmen dari kromosom DNA terlepas dan pada akhirnya akan menempel pada resipien yang sesuai (Quinn *et al.*, 2002). Menurut Golan *et al.*, (2008), pengertian dari proses transformasi adalah proses pemindahan DNA donor secara langsung oleh sel penerima bergantung pada kemampuan transformasinya. Transformasi sebagai proses dimana DNA bebas yang dilepaskan oleh bakteri, akan menempel pada dinding atau bagian lain dari sel bakteri lainnya, sehingga

bakteri penerima akan mengekspresikan gen yang baru diperoleh tersebut (Quinn *et al.*, 2002).

2.8. Uji Sensitifitas

Uji resisten adalah suatu pengujian untuk mengetahui kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Pemeriksaan uji kepekaan bakteri terhadap zat antibakterial disebut *sensitify test* (uji kepekaan bakteri). Menurut Pelezar and Chan (1988), zat antibakterial adalah suatu zat yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Antibiotik merupakan bahan yang cukup representatif untuk membunuh bakteri. Penggunaan antibiotik yang tidak terkendali telah menyebabkan terjadinya efek samping yang sangat membahayakan yaitu menyebabkan bakteri-bakteri tertentu menjadi tahan atau resisten terhadap antibiotik.

Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang (sumuran) dan metode kertas cakram. Metode lubang (sumuran) yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Metode *diffuse disc* merupakan uji yang didasarkan pada proses difusi antibakterial dari kertas cakram ke media agar yang mengandung bakteri uji. Metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri secara kualitatif yaitu dengan cara mengukur diameter zona hambatan pada pertumbuhan bakteri. Penentuan hambatan pertumbuhan bakteri dengan metode *diffuse disc* ditunjukkan dengan adanya daerah jernih di sekitar kertas cakram yang merupakan daerah yang tidak ditumbuhi bakteri. Makin efektif bahan antibakteri tersebut maka diameter daerah hambatan atau zona jernih akan semakin besar (Lay, 1994).

2.9. *Polymerase Chain Reaction*

Polymerase chain reaction (PCR) dikembangkan dari strategi yang digunakan untuk pengurutan *deoxyribo nucleic acid* (DNA). PCR dikembangkan pada pertengahan 1980-an dan memungkinkan sebagai salah satu teknik molekuler yang paling penting, yang diterapkan secara rutin. DNA template yang didenaturasi, akan memisahkan dua untai DNA. Hal ini diikuti dengan langkah pendinginan dimana suhu reaksi diturunkan yang memungkinkan untuk dua sintesis primer DNA mengikat (berhibridisasi) terhadap template. Primer-primer tersebut diletakan di balik untai DNA. Selanjutnya, suhu meningkat kembali (biasanya mencapai 74°C) dan pada stabilitas termonya enzim DNA polimerase mulai bergiliran melakukan sintesis. Secara kolektif, semua langkah-langkah merupakan satu siklus, dalam reaksi PCR secara konvensional dilakukan hingga mencapai 30 siklus. Peralihan yang berulang antara temperatur memungkinkan amplifikasi target DNA yang spesifik hingga satu juta kali (Quinn *et al.*, 2011).

Polymerase Chain Reaction ini merupakan teknik perbanyakan DNA secara *in vitro*. Dalam sistem kerjanya, PCR dilandasi oleh struktur DNA. Dalam keadaan nativenya, DNA merupakan double helix, yang terdiri dari dua buah pita yang berpasangan antiparalel antara satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa-basa yang komplementer, yaitu antara basa Adenin (A) dengan Thymine (T), dan Guanine (G) dengan Cytosin (C). Basa-basa itu terikat dengan molekul gula, deoksiribosa, dan setiap satu molekul gula berikatan dengan molekul gula melalui ikatan fosfat (Gaffar, 2007).

2.9.1. Tahapan *Polymerase chain reaction*

Terdapat tiga tahapan utama dalam pelaksanaan PCR di dalam setiap siklusnya yaitu: denaturasi, *annealing* dan reaksi polimerisasi (ekstensi) (Gaffar, 2007).

Selama proses denaturasi, *double stranded* DNA akan membuka menjadi *single stranded* DNA. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya (Gaffar, 2007),

Primer akan menuju daerah yang spesifik, dimana daerah tersebut memiliki komplemen dengan primernya. Pada proses *annealing*, ikatan hidrogen akan terbentuk. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C (Gaffar, 2007).

Reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai pada umumnya terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'nya. Jadi, seandainya ada 1 kopi gene sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 kopi, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007).

2.9.2. Komponen *Polymerase chain reaction*

Terdapat tiga komponen PCR yang dibutuhkan dalam pelaksanaan PCR yaitu: enzim DNA polymerase, primer dan reagen-reagen lainnya (Gaffar, 2007).

Dalam sejarahnya, PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragment DNA polymerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzim ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzim di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp. Selain itu, oleh karena suhu *annealing* yang rendah dan ekstensi yang hanya bisa dilakukan pada 37°C (suhu kerja Klenow fragment), hasilnya menjadi kurang spesifik (Gaffar, 2007).

Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim *Taq polymerase* yang memiliki keaktifan dalam suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Pemakaian *Taq polymerase* dalam konsentrasi yang terlalu besar akan mengakibatkan munculnya *background* produk non-spesifik. Sebaliknya, bila konsentrasi *Taq polymerase* terlalu rendah, maka proses amplifikasi berlangsung secara inefisien, dan produk amplifikasi yang diperoleh akan mempunyai konsentrasi yang relatif rendah (Gaffar, 2007).

Apabila memungkinkan primer yang dipilih adalah yang mengandung G+C sekitar 50%. Apabila memungkinkan, dihindari adanya polipurin atau polipirimidin. Selain itu, juga dihindari adanya struktur sekunder dan adanya komplementari antara primer-dimer (Gaffar, 2007).

Selain enzim dan primer, terdapat juga komponen lain yang ikut menentukan keberhasilan reaksi PCR. Komponen tersebut adalah dNTP untuk reaksi polimerisasi, dan buffer yang mengandung $MgCl_2$. Konsentrasi ion Mg^{2+} dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion Mg^{2+} ini sangat mempengaruhi proses primer *annealing*, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim dan fidelitas reaksi. Oleh sebab itu, penambahan berbagai pereaksi harus selalu diperhatikan, jangan sampai ada ion-ion lain maupun *chelating agent* yang dapat mengganggu konsentrasi ion Mg^{2+} dalam larutan. Secara umum, sebaiknya konsentrasi ion Mg^{2+} bebas yang terdapat dalam larutan adalah sekitar 2 mM (Gaffar, 2007).