

Deteksi Molekuler Mikroorganisme Patogen pada Bahan Pangan dengan Metode RT-PCR

(Molecular Detection of Food Pathogenic Microorganism by RT-PCR)

Dyah Ayu Widyastuti¹⁾ dan Fafa Nurdyansyah^{2)*}

¹⁾ Program Studi Pendidikan Biologi Universitas PGRI Semarang

²⁾ Program Studi Teknologi Pangan Universitas PGRI Semarang

Korespondensi penulis : fa2_2009@yahoo.com

ABSTRACT

Foodborne diseases caused by pathogenic microorganism is one of health threats which need to be guarded. Great number of species but little amount of cells that contaminated lead difficulties for detection of contaminating microorganism. Microorganism culture as conventional detection method considered less effective due to its time consuming and high contamination risk. Based on that facts, the rapid, effective, specific, and sensitive detection method is necessary to prevent outbreak caused by contaminated food. Molecular detection is highly recommend to be developed due to its specific and sensitive results based on certain molecular marker. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) is one of recommended methods to detect genetic substances of contaminating microorganism on foods. RT-PCR use species specific primers and probes so the specificity is higher than other methods. RT-PCR gives more specific and sensitive results to be developed as prevention of outbreaks by contaminating food.

Keywords: *microorganism, RT-PCR, pathogen, primer, probe*

ABSTRAK

Penyakit akibat makanan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen menjadi salah satu ancaman kesehatan yang perlu diwaspadai. Banyaknya jenis mikroorganisme patogen serta kecilnya jumlah sel yang mengontaminasi bahan pangan menjadikan deteksi mikroorganisme patogen dalam bahan pangan menjadi suatu tantangan tersendiri. Deteksi secara konvensional melalui kultur mikroorganisme dalam media tertentu dianggap kurang efektif karena memerlukan waktu yang relatif lama serta potensi kontaminasinya yang cukup besar. Oleh karena itu, diperlukan metode deteksi mikroorganisme patogen pada bahan pangan yang lebih cepat, efektif, spesifik, dan sensitif untuk mencegah wabah penyakit akibat kontaminasi bahan pangan. Deteksi molekuler banyak dikembangkan karena menyajikan hasil pengujian yang lebih spesifik dan sensitif berdasarkan penanda molekuler tertentu. Salah satu yang paling banyak dikembangkan adalah *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang dapat mendeteksi materi genetik mikroorganisme pengontaminasi makanan dengan menggunakan primer dan probe (penanda) yang spesifik. Deteksi dengan RT-PCR memberikan hasil yang lebih spesifik dan sensitif untuk mencegah penyebaran penyakit akibat bahan pangan yang terkontaminasi mikroorganisme patogen.

Kata kunci: mikroorganisme, RT-PCR, patogen, primer, probe

PENDAHULUAN

Kualitas dan keamanan bahan pangan sangat penting dalam mendukung kualitas kesehatan masyarakat. Namun, banyak jenis mikroorganisme patogen yang dapat mengkontaminasi bahan pangan dan mengakibatkan berbagai macam penyakit (Naravaneni & Jamil, 2005). Penyakit akibat makanan umumnya disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang dapat mengkontaminasi bahan makanan tertentu. Ancaman kontaminasi tersebut mengakibatkan masalah kesehatan serius, baik di Negara maju maupun berkembang (Zhao *et al.*, 2016; Karus *et al.*, 2017). Akibat dari kontaminasi mikroorganisme pada makanan cukup besar meliputi kerugian secara ekonomi maupun kesehatan masyarakat. Berdasarkan penelitian dari Billington *et al.* (2014), keracunan makanan akibat kontaminasi oleh mikroorganisme patogen di Amerika Serikat mencapai estimasi 9,4 juta kasus dengan 55.961 diantaranya dirawat di rumah sakit dan 1.351 meninggal dunia.

Mikroorganisme patogen yang mengkontaminasi bahan pangan dapat berupa bakteri, virus, fungi maupun parasit lainnya. Beberapa jenis bakteri kontaminan pada bahan pangan yang dapat pula menginfeksi manusia adalah *Echerichia coli* (O157:H7), *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *E. coli* produsen toksin Shiga lainnya (selain O157) (Zhao *et al.*, 2014), *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholera* O1, *V. cholera* O139, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C, dan *S. choleraesuis*. Patogen-patogen tersebut dapat ditemukan pada beberapa jenis bahan pangan, seperti bahan dasar pangan, makanan setengah matang (daging, seafood, unggas, dll), serta makanan siap saji (sayuran, buah, produk olahan susu, dll) (Zhao *et al.*, 2016).

Prosedur deteksi penyakit akibat kontaminasi patogen pada bahan pangan menggunakan standar identifikasi isolat pada kultur dengan media tertentu. Namun, prosedur standar tersebut membutuhkan waktu yang lama untuk dapat diketahui hasilnya (Zhao *et al.*, 2016). Metode identifikasi konvensional meliputi serangkaian prosedur subkultur dan identifikasi biotipe-serotipe yang meskipun memberikan hasil yang sensitif (Vidic *et al.*, 2017), tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama (Naravaneni & Jamil, 2005).

Pengembangan metode deteksi patogen pada makanan yang relatif cepat dengan hasil yang akurat, sensitif dan spesifik sangat diperlukan untuk mencegah semakin menyebarnya penyakit akibat infeksi patogen melalui makanan (Phaneuf *et al.*, 2016). Strategi yang banyak dilakukan untuk deteksi patogen secara cepat diantaranya melakukan skrining sekuen DNA target atau menggunakan probe untuk mengembangkan penanda DNA patogen penginfeksi (Lin & Lin, 2016), serta deteksi molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* sederhana dan pengembangannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit akibat makanan (*Foodborne diseases*)

Keamanan pangan tidak hanya merupakan isu dalam bidang pertanian, tetapi juga merupakan isu penting dalam bidang kesehatan. Hal tersebut berkaitan dengan banyaknya penyebaran penyakit akibat makanan (*foodborne diseases*) baik di negara berkembang maupun maju (Zhao *et al.*, 2014). Sebagian besar kasus penyakit yang berkaitan dengan usus maupun organ pencernaan yang lain disebabkan oleh adanya kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan yang dikonsumsi manusia (Karus *et al.*, 2016).

Penyakit akibat makanan tidak hanya menjadi sumber keparahan pada penderita yang terinfeksi, tetapi juga mengakibatkan mewabahnya infeksi, kematian pada beberapa kasus, bahkan kerugian finansial yang besar mencapai 51-77,7 milyar dolar (Billington *et al.*, 2014). Kontaminasi mikroorganisme patogen pada makanan setidaknya membuat 1 dari 6 orang terinfeksi dalam satu tahun. Beberapa diantara kasus infeksi akibat kontaminasi patogen pada bahan pangan dapat diatasi oleh respon imun penderita sendiri, namun beberapa kasus yang lain mengakibatkan keparahan pada penderita sehingga membutuhkan penanganan serius untuk mencegah terjadinya kematian (Carleton & Gerner-Smidt, 2016).

Frekuensi mewabahnya penyakit akibat kontaminasi patogen pada bahan pangan semakin meningkat di seluruh dunia karena mikroorganisme patogen dapat ditemukan pada saluran intestinal hewan yang diambil dagingnya untuk konsumsi manusia. Hal tersebut mengakibatkan mudahnya transmisi patogen dari hewan ke manusia selama rantai makanan berlangsung (Karus *et al.*, 2017). Kontrol yang ketat pada keseluruhan rangkaian proses pengolahan, pengemasan, distribusi, dan penyimpanan bahan pangan sangat diperlukan untuk mengantisipasi kontaminasi yang mungkin terjadi.

Kerugian akibat kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan

Kontaminasi bahan pangan oleh mikroorganisme patogen merupakan ancaman besar bagi kesehatan manusia. Selain itu, kerugian finansial akibat kerusakan baik bahan mentah maupun produk pangan yang terkontaminasi mikroorganisme patogen dinilai cukup signifikan bagi industri makanan. Salah satu cara untuk meminimalisasi potensi kontaminasi adalah dengan sterilisasi, namun akibat sterilisasi dan kondisi pemrosesan yang terlalu ekstrim justru dapat mengakibatkan perubahan fisiko kimia dan hilangnya kandungan nutrient pada bahan pangan (Hanna *et al.*, 2005).

Bakteri patogen pengontaminasi bahan pangan (selain pada Tabel 1) diantaranya adalah *Bacillus cereus* yang secara etiologis disebut sebagai agen penyebab penyakit gastrointestinal dan nongastrointestinal (Fricker *et al.*, 2007). *Salmonella* juga merupakan

salah satu genus bakteri yang berpotensi dalam kontaminasi bahan pangan. *Salmonella* dapat mengakibatkan penyakit tifoid maupun non tifoid, misalnya *S. enterica*, *S. typhi*, *S. thypoid*, *S. bongori*, dan lainnya (Malorny *et al.*, 2004). *Eschericia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk batang dapat pula mengontaminasi bahan pangan sehingga mengakibatkan gastroenteritis, peritonitis dan septisemia pada manusia (Vidic *et al.*, 2017). Selain *E. coli*, jenis bakteri yang juga dapat mengakibatkan penyakit pada saluran pencernaan hingga mengakibatkan diare adalah *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia enterocolitica*, dan *Cronobacter* sedangkan *Clostridium botulinum* dapat mengakibatkan kerusakan pada produk olahan daging dan menyebabkan terjadinya botulisme (Carleton & Gerner-Smidt, 2016).

Tabel 1. Daftar mikroorganisme patogen pada bahan pangan (Billington *et al.*, 2014)

| Patogen | Bahan Pangan | Konsentrasi Kontaminasi |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Campylobacter</i> | Hati sapi | 3,6 MPN/g |
| <i>Eschericia coli</i> O157:H7 | Hati sapi | 0,04 – 0,18 CFU/g |
| | Daging burger beku | 1,45 MPN/g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Keju | Mendekati 20 |
| | | CFU/g |
| <i>Salmonella</i> | Keripik paprika berbumbu | 0,04 – 0,45 CFU/g |
| | | Tepung |

Keterangan: Nilai **CFU** ~ **MPN**

CFU: Colony Forming Unit, MPN: Most Probable Number

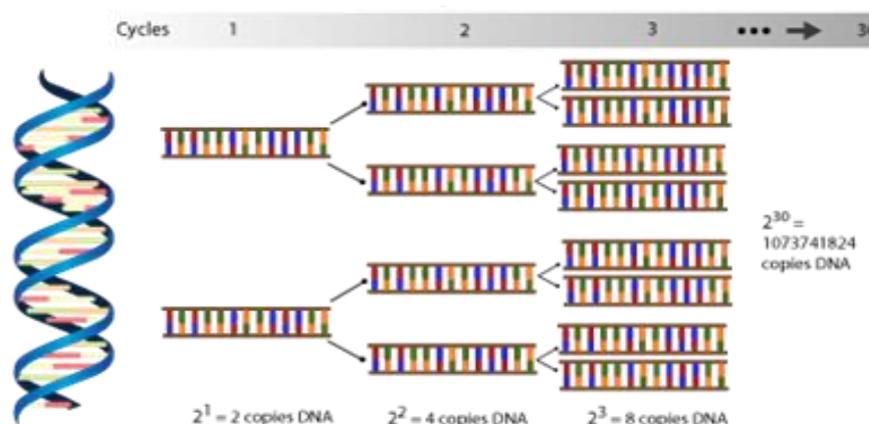
Selain bakteri, fungi juga merupakan mikroorganisme yang mungkin mengontaminasi bahan pangan. Hal tersebut dimungkinkan dengan adanya produksi toksin oleh fungi (Bleve *et al.*, 2003). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* merupakan salah satu jenis fungi yang dapat mengontaminasi pisang. Kontaminasi *F. oxysporum* pada pisang mengakibatkan penyakit layu (*Fusarium wilt of banana/FWB*). Penyakit layu pada pisang juga sering disebut sebagai penyakit Panama. Kontaminasi tersebut menyebabkan menurunnya produksi pisang di seluruh dunia (Lin & Lin, 2016). *Aspergillus flavus* juga berpotensi untuk menyebabkan kontaminasi pada bahan pangan melalui produksi aflatoksin yang dapat mengakibatkan karsinoma hati dalam jangka panjang (Barnes & White, 2016).

Perkembangan metode deteksi mikroorganisme patogen pada bahan pangan

Deteksi mikroorganisme pada bahan pangan secara klinis memberikan beberapa tantangan tersendiri. Tantangan tersebut meliputi rendahnya level kontaminasi sehingga pengambilan sampel secara representatif dirasa sangat sulit (Hanna *et al.*, 2005). Metode konvensional dengan melihat bukti gejala infeksi, isolasi dan kultur patogen, observasi morfologi, serta uji patogenitas dan biokimia masih memiliki banyak kelemahan untuk mendeteksi adanya mikroorganisme patogen pada bahan pangan (Lin & Lin, 2016). Beberapa kelemahan tersebut meliputi proses yang terlalu panjang sehingga membutuhkan waktu relatif lama, sensitivitas dan spesifitas yang rendah, membutuhkan banyak tenaga, dan belum bisa mendeteksi kontaminasi pada fase awal. Padahal, deteksi mikroorganisme patogen pada fase awal kontaminasi dapat menurunkan tingkat keparahan serta menjadi rujukan perawatan dan pengobatan selanjutnya.

Teknologi lain untuk deteksi mikroorganisme patogen pada bahan pangan adalah teknologi biosensing. Biosensor mengenali biomarker target dan karakteristik tiap patogen melalui bioreseptor yang merupakan elemen sensor tidak bergerak (*immobilized sensing element*). Bioreseptor dapat berupa antibody monoklonal, RNA, DNA, glycan, lektin, enzim, jaringan, maupun sel utuh (*whole cell*). Biosensor merupakan komponen penting karena memiliki karakter biokimia dengan sensitifitas dan selektifitas yang tinggi untuk mendeteksi penanda biologis pada patogen (Vidic *et al.*, 2017).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu metode molekuler yang cukup sensitif untuk mendeteksi penyakit-penyakit infeksius, salah satunya adalah penyakit akibat makanan (*Foodborne diseases*). Tetapi, metode ini cukup jarang digunakan karena sulitnya ekstraksi asam nukleat dan deteksi sekuen asam nukleat spesifik dari materi genetik patogen (Barnes and White, 2016).

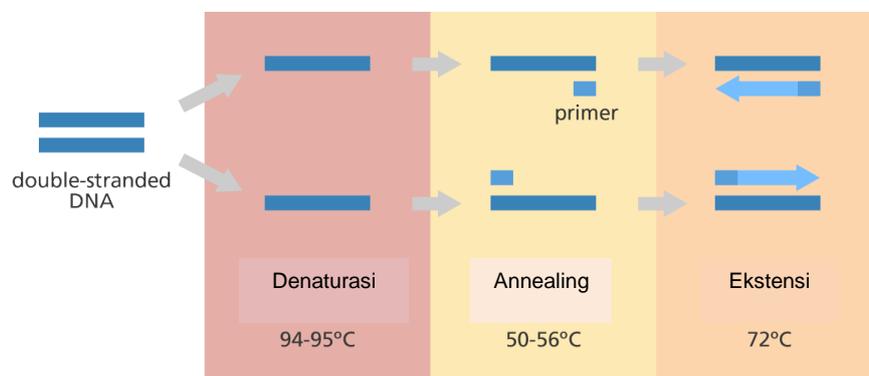


Gambar 1. Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (GeneticID, 2016)

Metode PCR dapat dimanfaatkan untuk memperbanyak salinan DNA demi tujuan tertentu, termasuk identifikasi adanya sekuen asing dalam suatu sampel DNA tertentu (Meade & Bollen, 1994). Pada metode PCR diperlukan cetakan DNA, primer, $MgCl_2$, dNTP, dan enzim Taq-polimerase. Primer merupakan urutan nukleotida dengan panjang tertentu yang berfungsi sebagai inisiator reaksi PCR. Primer memiliki panjang 18-24 nukleotida dengan nilai *GC content* antara 40-60%. Satu siklus reaksi PCR terdiri atas 3 tahap, yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi (Gambar 2).

Pada deteksi kontaminasi bahan pangan oleh mikroorganisme patogen, PCR dimanfaatkan untuk dapat menemukan adanya sekuen DNA spesifik yang dimiliki oleh kontaminan tersebut. Primer yang digunakan harus didesain sesuai dengan sekuen DNA target sehingga produk PCR yang dihasilkan bisa menunjukkan ada tidaknya hasil amplifikasi DNA dari mikroorganisme kontaminan yang menjadi target deteksi. Ada tidaknya sekuen DNA target dapat dilihat dari hasil visualisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa.

Persentase yang kecil pada DNA mikroorganisme patogen yang mengontaminasi bahan pangan menjadikan amplifikasi DNA dengan PCR konvensional belum dapat mendeteksi adanya kontaminasi secara sensitif. Satu kali proses PCR yang mencapai 35-40 siklus menjadikan proses deteksi melalui amplifikasi DNA target dapat terlewat karena siklus yang terlalu panjang.



Gambar 2. Tahapan dalam 1 siklus reaksi *Polymerase Chain Reaction* (Wellcome Genome Campus, 2015)

Perkembangan teknik dalam metode PCR juga turut mendukung perkembangan deteksi mikroorganisme patogen yang mengontaminasi bahan pangan. Salah satu teknik PCR yang banyak dikembangkan untuk alternatif deteksi patogen adalah *Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Menurut Nadkarni *et al.* (2002), perbedaan pada ukuran sel bakteri, agregasi bakteri, dan keberadaan material kontaminasi lain menyebabkan sulitnya deteksi kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan.

Oleh karena itu, metode deteksi molekuler juga harus selalu dikembangkan untuk meningkatkan kemampuan deteksi kontaminasi secara lebih spesifik dan sensitif. Metode RT-PCR menggunakan primer dan probe sebagai penanda tertentu untuk mendeteksi 16S rDNA yang dimiliki oleh mikroorganisme target sehingga hasil deteksi akan lebih spesifik. Bleve *et al.* (2003) menyatakan bahwa primer yang digunakan dalam RT-PCR spesifik untuk elongasi salinan DNA sesuai dengan DNA target tertentu.

Berbagai metode deteksi mikroorganisme patogen banyak berkembang namun, masih jarang sekali pengembangan metode untuk pencegahan kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan. Salah satu metode preventif untuk mencegah kontaminasi tersebut adalah dengan nanobioteknologi. Metode ini merupakan kombinasi antara nanoteknologi dengan bioteknologi. Pemanfaatan nanobioteknologi secara preventif misalnya dengan penggunaan nanopartikel perak yang dapat mematikan patogen sebelum bahan pangan diproses lebih lanjut (Billington *et al.*, 2014).

Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk deteksi molekuler mikroorganisme patogen pada bahan pangan

Salah satu kesulitan dalam deteksi mikroorganisme patogen pada bahan pangan diakibatkan oleh kecilnya jumlah mikroorganisme patogen tersebut ($< 100 \text{ c.f.u.g}^{-1}$) diantara banyaknya jenis mikroorganisme lainnya. Kesulitan lainnya adalah untuk membuktikan bahwa strain mikroorganisme pada sampel bahan pangan benar-benar bersifat patogen bagi manusia (Naravaneni & Jamil, 2005).

Metode berbasis PCR dapat mendeteksi mikroorganisme patogen melalui identifikasi sekuen DNA target yang dapat menghasilkan sensitifitas dan spesifitas cukup tinggi (Diederer *et al.*, 2007). Metode PCR dapat digunakan untuk deteksi patogen secara molekuler dengan membandingkan ukuran DNA target dengan marker atau membandingkan sekuen DNA target dengan sekuen yang terdapat pada bank gen. PCR konvensional memiliki beberapa kelemahan seperti waktu running yang cukup lama dan berpotensi untuk memberikan hasil positif palsu akibat kontaminasi di laboratorium (Fricker *et al.*, 2007). Oleh karena itu, deteksi dengan metode PCR yang lebih spesifik harus dikembangkan.

Metode RT-PCR semakin banyak digunakan untuk deteksi molekuler mikroorganisme karena jika dibandingkan dengan metode kultur konvensional, metode ini lebih sederhana, cepat, dan sangat sensitif (Vincart *et al.*, 2007). *Real-Time* PCR memungkinkan setiap siklus amplifikasi DNA diobservasi dengan sistem computer untuk melihat sekuen dari produk PCR tersebut. Sensitivitas RT-PCR diperoleh melalui penggunaan penanda fluoresen yang akan berikatan dengan DNA target yang dikenal sebagai probe/penanda (Levin, 2004).

Real-time PCR dapat digunakan untuk menggandakan DNA target dari suatu organisme untuk tujuan mengetahui kuantitas DNA secara relatif, ekspresi gen (kuantifikasi mRNA), deteksi keberadaan DNA target, menentukan jenis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), menentukan kurva T_m (*Melting Curve*), dan melakukan skrining *High Resolution Melting* (HRM). Pada PCR konvensional, deteksi keberadaan DNA dilakukan di akhir reaksi dan pengamatan keberadaan DNA hasil amplifikasi dilakukan di gel agarose setelah dilakukan proses elektroforesis. Berbeda halnya pada RT-PCR yang memungkinkan pengamatan DNA dilakukan saat reaksi masih berlangsung. Keberadaan DNA diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe. Pengamatan hasil tidak lagi membutuhkan tahap elektroforesis.

Primer dan probe untuk real time-PCR (RT-PCR) dipilih melalui penjajaran (*alignment*) keseluruhan gen pada patogen dan determinasi sekuen menggunakan perangkat lunak *Primer Express* (*Applied Biosystem*). Fragmen yang akan diamplifikasi dengan RT-PCR terlebih dahulu dicek menggunakan BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) untuk menghindari kesalahan positif (*false positive*) yang diakibatkan oleh homologi sekuen (Vincart *et al.*, 2007).

Real Time PCR (RT-PCR) memungkinkan deteksi patogen pada bahan pangan dalam waktu yang lebih cepat, memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi, serta memungkinkan perhitungan hasil amplifikasi materi genetik DNA patogen target. Resiko terjadinya kontaminasi silang dapat direduksi secara signifikan serta hasil deteksi lebih optimal karena manipulasi setelah proses PCR tidak diperlukan (Fricker *et al.*, 2007). Deteksi molekuler mikroorganisme patogen pada bahan pangan dengan RT-PCR memiliki potensi sebagai metode yang cepat dan dapat dipercaya untuk mengontrol sampel yang terkontaminasi sepanjang rantai produksi makanan (Malorny *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan memerlukan penanganan yang tepat. Deteksi yang spesifik, sensitif, cepat, dan mudah dapat mengurangi resiko penularan penyakit akibat kontaminasi bahan pangan (*foodborne diseases*). Metode deteksi molekuler dengan RT-PCR dianggap memiliki keunggulan dibandingkan deteksi melalui kultur mikroorganisme maupun PCR konvensional. RT-PCR memungkinkan deteksi materi genetik mikroorganisme patogen pada bahan pangan dengan penggunaan primer dan probe yang sesuai sehingga akurasinya lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, R. A. and P. L. White. 2016. PCR technology for detection of invasive Aspergillosis. *Journal of Fungi* 2 (23): 1-9.
- Billington, C., J. A. Hudson, and E. D'Sa. 2014. Prevention of bacterial foodborne disease using nanobiotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications* (7): 73-83.
- Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 4116-4122.
- Carleton, H. A. and P. Gerner-Smidt. 2016. Whole-genome sequencing is taking over foodborne disease surveillance. *Microbe* 11 (7): 311-317.
- Diederer, B. M. W., C. M. A. de Jong, F. Marmouk, J. A. W., Kluytmans, M. F. Peeters, and A. V. der Zee. 2007. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *Journal of Medical Microbiology* (56): 94-101.
- Fricker, M., U. Messelh u ber, U. Busch, S. Scherer, and M. Ehling-Schulz. 2007. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (6): 1892-1898.
- GeneticID. 2016. Genetic analysis. Retrieved from <http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Genetic-analysis>.
- Hanna, S. E., C. J. Connor, and H. H. Wang. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science* 70 (3): 49-53.
- Karus, A., F. Ceciliani, A. S. Bonastre, and V. Karus. 2017. Development of simple multiplex real-time PCR assays for foodborne pathogens detection and identification on lightcycler. *Macedonian Veterinary Review* 40 (1): 53-58.
- Levin, R. E. 2004. The application of real-time PCR to food and agricultural systems: A review. *Food Biotechnology* 18 (1): 97-133.
- Lin, Y. and Y. Lin. 2016. Recent developments in the molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Nature and Science* 2 (10).
- Malorny, B., E. Paccassoni, P. Fach, C. Bunge, A. Martin, and R. Helmuth. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12): 7046-7052.
- Meade, B. D. and A. Bollen. 1994. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *Journal of Medical Microbiology* (41): 51-55.
- Nadkarni, M. A., F. E. Martin, N. A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* (148): 257-266.

- Naravaneni, R. and K. Jamil. 2005. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology* (54): 51-54.
- Phaneuf, C. R., B. Mangadu, M. E. Piccini, A. K. Singh, and C. Koh. 2016. Rapid, portable, multiplexed detection of bacterial pathogens directly from clinical sample matrices. *Biosensors* 6 (49): 1-10.
- Vidic, J., M. Manzano, C. Chang, and N. Jaffrezic-Renault. 2017. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary Research* 48 (11): 1-22.
- Vincart, B., R. D. Mendonça, S. Rottiers, F. Vermeulen, M. J. Struelens, and O. Denis. 2007. A specific real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis*. *Journal of Medical Microbiology* (56): 918-920.
- Wellcome Genome Campus. 2015. What is PCR (polymerase chain reaction)? Retrieved from <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>.
- Zhao, X., C. Lin, J. Wang, and D. H. Oh. 2014. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (3): 297-312.
- Zhao, Y., H. Wang, P. Zhang, C. Sun, X. Wang, X. Wang, R. Yang, C. Wang, and L. Zhou. 2016. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Scientific Reports* (6): 1-8.