

PENGUJIAN KANDUNGAN BAKTERI *Salmonella* sp. PADA IKAN TUNA (*Thunnus* sp.) MENGGUNAKAN METODE *Real-time* PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Testing the Content of Salmonella sp. on Tuna (Thunnus sp.) using Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) Method

Iftachul Farida^{*)}, Desy Febrianti, I Gede Ivan Ari Dewa Mahaputra

Pengolahan Hasil Laut, 1 Politeknik KP Jembrana, Desa Pengambangan, Kecamatan Negara, Kabupaten Jembrana, Bali 82218, Indonesia

*Korespondensi penulis : farida.iftachul89@gmail.com

Diterima 13 Februari 2023, Disetujui 23 Maret 2023

ABSTRACT

Fish is a commodity that decomposes easily and quickly (highly perishable food) because it contains protein and water which is quite high, so it requires quick, clean, careful, and cool handling (quick, clean, careful, and cool). Poor handling caused fish to be easily contaminated with pathogenic bacteria, one of which was Salmonella sp. This study used fresh and processed tuna samples in Denpasar, Bali. The purpose of this study was to detect Salmonella sp. on tuna using real-time PCR method. In addition, to strengthen the test results for Salmonella sp. using real-time PCR, sensory testing was also carried out on appearance, texture, and smell. The test results showed that one sample of tuna was indicated to contain Salmonella sp., this was because the sample had reached a Threshold Cycle (Ct) value of 22.11 through the amplification curve. These results were supported by the results of sensory testing performed on samples that were positive for Salmonella sp. The average sensory value was 26.5 in the Mid Pass category.

Keyword: *real time-polymerase chain reaction, Salmonella sp., sensory testing*

ABSTRAK

Ikan merupakan komoditas yang mudah dan cepat membusuk (*high perishable food*) karena mengandung protein dan air yang cukup tinggi, sehingga diperlukan penanganan yang cepat, bersih, cermat dan dingin (*quick, clean, careful and cool*). Penanganan yang kurang baik menyebabkan ikan akan mudah tercemar bakteri patogen salah satunya bakteri *Salmonella* sp. Penelitian ini menggunakan sampel ikan tuna segar dan olahan di wilayah Denpasar, Bali. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mendeteksi bakteri *Salmonella* sp. pada ikan tuna menggunakan metode *real-time* PCR. Selain itu untuk memperkuat hasil pengujian *Salmonella* sp. menggunakan *real-time* PCR, juga dilakukan pengujian sensori terhadap kenampakan, tekstur, dan bau. Hasil pengujian menunjukkan bahwa satu sampel ikan tuna terindikasi mengandung bakteri *Salmonella* sp., hal ini dikarenakan sampel telah mencapai nilai *Threshold Cycle* (Ct) 22,11 melalui kurva amplifikasi. Hasil tersebut didukung dengan hasil pada pengujian sensori yang dilakukan pada sampel yang positif *Salmonella* sp. didapatkan nilai rata rata sensori sebesar 26,5 dengan kategori *Mid Pass*.

Kata kunci: pengujian sensori, real time-polymerase chain reaction, *Salmonella* sp.

PENDAHULUAN

Ikan merupakan komoditas yang mudah dan cepat membusuk (*high perishable food*) karena mengandung protein dan air yang cukup tinggi, sehingga, memerlukan penanganan yang cepat, bersih, cermat dan dingin (*quick, clean, careful and cool*).

Penurunan mutu ikan biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis dan kondisi biologis ikan, proses kematian, waktu, cara penanganan, dan fasilitas yang digunakan dalam penanganan ikan (Metusalach *et al.*, 2014). Penanganan yang kurang baik menyebabkan ikan akan mudah tercemar

bakteri patogen salah satunya bakteri *Salmonella* sp.

Salmonella sp. merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit yang disebut Salmonellosis (demam tifus dan gastroenteritis) (Doyle dan Cliver, 1990). Salmonellosis atau yang disebut dengan demam tifus (typhoid) yang dihasilkan dari invasi bakteri pada aliran darah kedua. Selain Salmonellosis, penyakit lain yang disebabkan karena bakteri *Salmonella* sp. adalah penyakit gastroenteritis akut yang dihasilkan dari infeksi pada makanan (Todar, 2005). Penyebab terjadinya kontaminasi *Salmonella* sp. pada produk perikanan adalah karena kurangnya tindakan sanitasi dan higienitas.

Pada tahun 2009, lebih dari 40.000 kasus *Salmonella* sp. dilaporkan Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit (CDC) oleh laboratorium kesehatan masyarakat di seluruh negara. Hal ini mewakili penurunan sekitar 15% dari tahun sebelumnya, namun meningkat 4,2% sejak tahun 1996 (CDC, 2009). Kasus dengan etiologi *Salmonella* sp. khususnya pada demam typhoid diperkirakan berkisar antara 16 juta kasus dan terjadi 600.000 kematian di seluruh dunia (Das, 2012).

Pada persyaratan mutu ikan segar yang diujikan sesuai SNI 7530.1:2006 (BSN, 2006) yaitu ikan harus bersih, bebas dari setiap bau yang menandakan pembusukan, bebas dari tanda dekomposisi dan pemalsuan, bebas dari sifat-sifat alamiah lain yang dapat menurunkan mutu serta tidak membahayakan kesehatan. Secara sensori kenampakan mata cerah dan cemerlang, bau segar, serta tekstur elastis, padat dan kompak. Syarat mutu ikan segar untuk uji cemaran mikroba *Salmonella* sp. adalah negatif per 25 gr (BSN, 2015).

Pengujian *Salmonella* perlu dilakukan untuk mengidentifikasi adanya kandungan bakteri *Salmonella* pada olahan ikan tuna menggunakan *real-time* PCR. Metode *real-time*-PCR mampu mendeteksi lebih cepat, metode lebih sederhana dan sensitif, tidak memerlukan teknik lanjutan dengan elektroforesis sehingga mengurangi terjadinya kontaminasi di laboratorium dan reaksi positif palsu. Sensitivitas *real-time* PCR diperoleh melalui penggunaan penanda fluorescence yang akan berikatan dengan DNA target yang dikenal sebagai

probe/penanda (Levin, 2004). Pengujian *Salmonella* sp. menggunakan metode *real-time* PCR dengan prinsip didasarkan pada reaksi nuklease untuk memperkuat urutan genom dalam mikroorganisme target.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di PT Seafood Inspection Laboratory, Denpasar, Bali selama bulan Maret sampai dengan Mei 2022. Sampel ikan tuna diuji dari berbagai perusahaan olahan ikan tuna yang berada di wilayah Denpasar dan sekitarnya.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pengujian sensori dan *Salmonella* sp. menggunakan metode *real-time* PCR yaitu timbangan, roller, gunting, talenan, water bath, inkubator, mikropipet, tip, schott duran, pellet, centrifuge, vortex, PCR tube, stomacher bag, Laminar air flow, Spindown, mesin *real-time* PCR, talenan dan penggaris.

Bahan yang digunakan meliputi: ikan tuna dalam bentuk segar dan olahan, *buffered peptone water*, Kit Bio Premier (mengandung komponen Primer Sa/1598 F (1000 µM Solution), Primer Sa/1859 R (1000 µM Solution), Primer IAC F (1000 µM Solution), Primer R (1000 µM Solution), Probe Sa/1631PFAM (100 µM Solution), Probe IAC30Pcy5 (100 µM Solution), IAC DNA template (0,75 pg/µL), 20% sucrose (0,22µM filter-sterilized) dan PCR grade water, *lysis buffered*. Urutan primer dan probe yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Primers ¹	Gen Bank #	Bases	5' → 3' Sequence
Sa/1598 F	U43273	20	AACGTGTTCCGTGCGTAAT
Sa/1859 R	U43273	20	TCCATCAAATTAGCGGAGGC
IAC F		22	AGTTGCAGTGTAAACCGTCATGT
IAC R		22	TCGACGAGACTCTGCTGTAAAG
Probes ¹			
Sa/1631PFAM		20	FAM-TGGAAGCGCTCGCATTGTGG-BHQ
IAC30Pcy5		20	Cy5-ATCTGCGTCGCACGTGCA-BHQ

¹Primer/Probe name composed of target (Sa) = *Salmonella* species targeting *invA* gene, IAC = Internal Amplification Control, 5' base position of oligonucleotide in the respective gene sequence specified in column 3 and forward primer (F), reverse primer (R) or probe (P).

Gambar 1. Urutan primer dan probe DNA untuk mengidentifikasi bakteri *Salmonella* sp.

Prosedur pengujian *Salmonella* sp. dengan metode *real-time* PCR

1) *Pre-enrichment* dan *enrichment*

Sampel tuna ditimbang seberat 25 gram kemudian dimasukkan ke dalam *stomacher bag*. Selanjutnya dihomogenkan dengan cara digiling menggunakan *roller*. Sampel dihomogenkan dengan 225 ml *buffered peptone water* dan diinkubasi selama ± 18 jam pada suhu 95°C.

2) Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA diawali dengan mengkomposit 4 sampel dengan mengambil 375 μ l dan dimasukkan ke dalam 1,7 ml microtube, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang sedangkan pellet ditambahkan 100-200 μ l *Lysis buffer* dan

dihomogenkan dengan *vortex* atau memipet naik turun. Selanjutnya, microtube diinkubasi di *waterbath* dengan suhu 95-100°C selama 15 menit, dan disentrifuge kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit.

3) *real-time* PCR Preparation

a) PCR Mix

Tahap selanjutnya menyiapkan reagen Bio Premier Kit PCR. Reagen tersebut divortex terlebih dahulu sebelum digunakan. Dalam pengujian, reagen *Salmonella* sp. menggunakan 1 reaksi yang terdiri dari beberapa komponen seperti master mix dan *Salmonella* Assay. Untuk menyiapkan 1 reaksi, tambahkan 16 μ l master mix dan 2 μ l *Salmonella* Assay, selanjutnya kedua reagen dicampurkan dengan cara memipet naik turun.

Tabel 1. Komposisi *real-time* PCR Mix

Deskripsi	Vial	Volume Pengujian
Master Mix III	A	16 μ l
10x <i>Salmonella</i> sp. assay Mix	B	2 μ l
Total		18 μ l

PCR tube diberikan kode tube untuk sampel kontrol positif dan kontrol negatif. Sebanyak 18 μ l mix PCR dimasukkan ke masing-masing PCR tube (tube untuk sampel, kontrol positif dan kontrol negatif). Tahap selanjutnya yaitu menambahkan 2 μ l sampel DNA, 2 μ l kontrol positif dan 2 μ l kontrol negatif ke PCR tube yang sesuai.

Tutup PCR tube dan homogenkan dengan *spindown*. Langkah terakhir masukkan tube ke dalam mesin *real time*-PCR

b) Program Set Up

Sebelum melakukan pengujian set up program, perlu dilakukan dengan mengikuti waktu dan suhu program seperti pada tabel berikut.:

Tabel 2. Program set up *real-time* PCR

Fase	Langkah	Suhu	Waktu	Akuisisi
Holding stage	Langkah 1	50°C	2 min	Tidak
	Langkah 2	95°C	5 min	Tidak
Amplifikasi -40 cycle	Langkah 1	95°C	30s	Tidak
	Langkah 2	60°C	30s	Ya
	Langkah 3	72°C	30s	Tidak

4) Interpretasi

Probe untuk *Salmonella* sp. deteksi DNA diberi label dengan FAM dan harus dianalisis dalam saluran fluoresensi yang sesuai. Probe untuk dideteksi Kontrol Internal (IC) dianalisis di saluran ROX.

Dalam sampel positif, kurva sigmoid harus diperhatikan.

a) Kontrol

Untuk memvalidasi pengujian, kontrol harus memiliki hasil berikut :

Tabel 3. Kontrol *real-time* PCR

	<i>Salmonella</i> spp. Deteksi FAM	IC Deteksi ROX
Negatif Kontrol	Negatif	Positif
Positif Kontrol	Positif	Positif

jika kontrol tidak cocok dengan hasil ini, eksperimen harus ulang.

b) Sampel

Interpretasi hasil sampel dirangkum dalam tabel berikut :

Tabel 4. Interpretasi RT-PCR

<i>Salmonella</i> spp. Deteksi FAM	IC Deteksi ROX	Interpretasi
Positif	Positif/Negatif	Positif
Negatif	Positif	Negatif
Negatif	Negatif	<i>Invalid**</i>

Prosedur pengujian sensori

Pengujian sensori yang dilakukan mengacu pada standar perusahaan dengan

modifikasi USDC (*US Department of Commerce National Sensory Section*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian *Salmonella* sp. menggunakan real-time PCR

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, diperoleh hasil pengujian

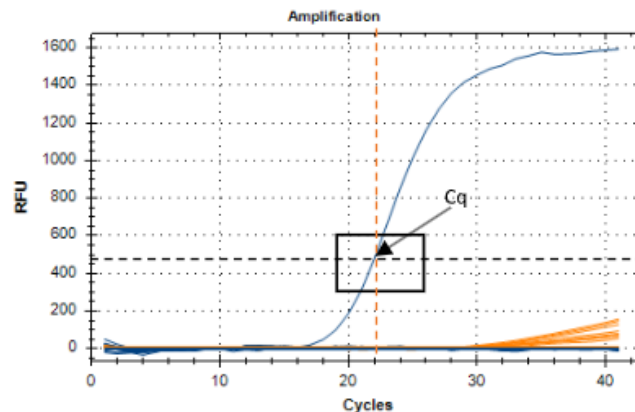
Salmonella sp. pada sampel ikan Tuna. Hasil tersebut tersaji pada tabel tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengujian *Salmonella* sp. Metode real-time PCR menggunakan metode ELISA

No.	Flour	Komposit	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Ket.
1	FAM	NC S		0.00	0.000	Neg Ctrl
	ROX	NC S	23.46	23.46	0.000	
2	FAM	Komposit A1C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A1C	23.58	23.58	0.000	
3	FAM	Komposit A2C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A2C	21.49	21.49	0.000	
4	FAM	Komposit A3C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A3C	23.27	23.27	0.000	
5	FAM	Komposit A4C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A4C	23.91	23.91	0.000	
6	FAM	Komposit A5C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A5C	23.61	23.61	0.000	
7	FAM	Komposit A6C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A6C	23.36	23.36	0.000	
8	FAM	Komposit A7C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A7C	23.88	23.88	0.000	
9	FAM	Komposit A8C		0.00	0.000	Negatif
	ROX	Komposit A8C	23.91	23.91	0.000	
10	FAM	Komposit A9C	22.11	22.11	0.000	Positif
	ROX	Komposit A9C	23.68	23.68	0.000	
11	FAM	PC S	19.86	19.86	0.000	Pos Ctrl
	ROX	PC S	22.24	22.24	0.000	

Berdasarkan tabel 5 Komposit sampel A9C teridentifikasi *Salmonella* sp. dengan Cq 22,11. Kode sampel A9C merupakan komposit yang terdiri dari 4 sampel ikan tuna. Komposit A9C terdiri dari sampel A33, A34, A35 dan A36. Selanjutnya, komposit yang terdeteksi *Salmonella* sp. dilakukan

pengujian secara individual dan didapatkan hasil sampel yang terdeteksi positif kandungan *Salmonella* sp. terdapat pada kode sampel A34. Hasil pengujian berupa grafik amplifikasi yang dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2 Kurva hasil amplifikasi positif mengandung DNA *Salmonella* sp.

Gambar 2 menunjukkan hasil kurva amplifikasi pengujian *Salmonella* sp. Kurva biru menandakan adanya FAM atau DNA *Salmonella* sp. Kurva akan aktif jika DNA *Salmonella* sp. terdeteksi pada saat proses amplifikasi. FAM berfungsi untuk mendeteksi DNA target yang ingin dibaca, sedangkan kurva kuning menandakan ROX atau internal kontrol yang berfungsi untuk mengetahui apakah terjadi kesalahan dari proses *pre-enrichment* hingga *real-time* PCR *preparation*.

Titik perpotongan antara grafik sigmoid dan *baseline threshold* jika direfleksikan pada sumbu-x (Cycle) adalah *threshold cycle* (Ct) bagi sampel yang diamplifikasi (Pestana *et al.*, 2010). Pada kurva amplifikasi hasil pengujian *Salmonella* sp. grafik sigmoid berpotongan dengan *baseline threshold* pada siklus 22,11. Hasil peningkatan *fluorescence* digambarkan melalui kurva amplifikasi yang menunjukkan tiga fasa yaitu fasa awal, fasa eksponensial atau puncak dan fasa plateau atau stabil (Vaerman, 2004). Pada pengujian *real-time* PCR menghasilkan sekitar satu miliar molekul DNA. Nilai Ct berhubungan langsung dengan besaran awal DNA dan dihitung dengan rumus: Jumlah DNA = 2^{Ct} . Berdasarkan rumus tersebut maka jumlah

DNA *Salmonella* sp. yang terkandung pada sampel ikan tuna yang tereplikasi sebanyak 2^{22} atau 4.194.304 DNA.

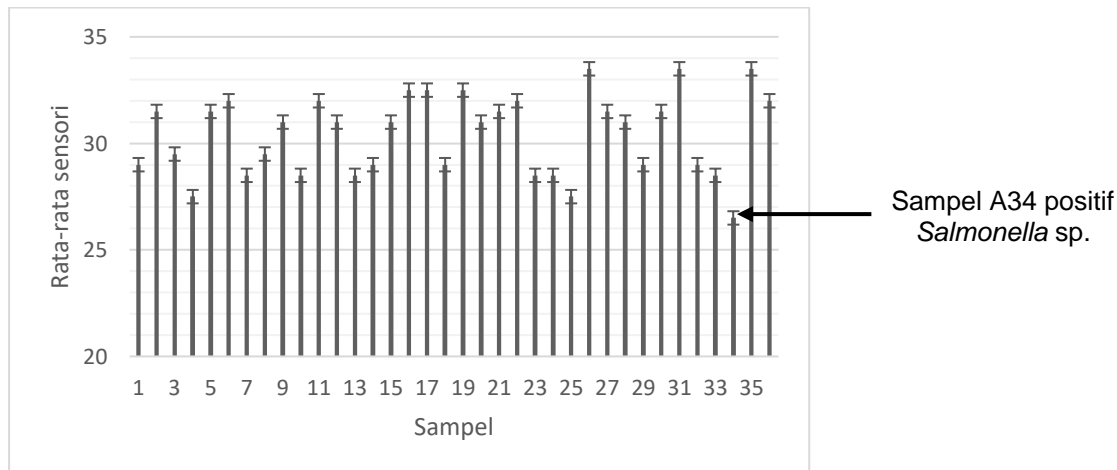
Metode deteksi *Salmonella* sp. dengan metode *real-time* PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode *pre-enrichment* dan tanpa metode *pre-enrichment*. Pada penelitian ini dengan menggunakan *pre-enrichment*. Tahap *pre-enrichment* bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri, karena umumnya protokol PCR memerlukan konsentrasi mikroorganisme target yang sangat tinggi yang biasanya diperoleh hanya setelah pengayaan sampel (Mynt *et al.*, 2006). Tahap *pre-enrichment* penting dilakukan sebagai upaya dalam mengurangi kesalahan negatif pada pengujian (Nurjanah *et al.*, 2021).

Ditemukannya *Salmonella* sp. pada sampel ikan tuna, hal ini diduga adanya penanganan atau pengolahan yang kurang baik. Seperti kontaminasi dari pekerja (sehabis membersihkan ikan yang lain, pekerja tidak mencuci tangan), peralatan yang digunakan kotor tidak dicuci terlebih dahulu. Adapun air yang digunakan dalam proses penanganan ikan tuna segar tidak menggunakan air yang bersih (tidak sesuai dengan standar air minum), tetapi melainkan

menggunakan air laut yang kotor dimana disekeliling air laut tersebut berserakan sampah, serta lingkungan yang tidak bersih seperti terdapat sampah di dekat tempat penjualan ikan.

Hasil pengujian sensori

Dalam memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas produk perikanan khususnya ikan tuna (*Thunnus* sp.) yang akan diekspor maupun dipasarkan di dalam negeri, maka perlu dilakukan pengujian sensori/organoleptik. Rata-rata hasil pengujian organoleptik sampel ikan tuna tersaji pada gambar 3.



Gambar 3 Rata-rata hasil pengujian sensori/organoleptik sampel ikan tuna

Berdasarkan gambar 3 sampel A34 memiliki rata-rata nilai sensori/organoleptik sebesar 26,5 dengan kategori *Mid Pass*. Menurut Afrianto dan Liviawaty (2011), cemaran *Salmonella* pada produk perikanan tidak dapat dibuktikan melalui pengujian sensori, karena sensori tidak dapat menunjukkan cemaran biologis. Namun, terdapat hubungan antara jumlah total bakteri dengan menurunnya mutu secara organoleptik. Menurut Laismina *et al.*, (2014) menjelaskan kemunduran mutu ikan disebabkan adanya reaksi enzimatik dan aktivitas bakteri. Kedua aktivitas ini menguraikan komponen penyusun jaringan tubuh ikan sehingga menghasilkan perubahan fisik seperti daging ikan menjadi lunak dan perubahan kimia yang menghasilkan senyawa mudah menguap dan berbau busuk.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian bakteri *Salmonella* sp. menggunakan metode *real-time* PCR pada sampel ikan tuna terdapat satu yang positif mengandung bakteri *Salmonella* sp. hal ini dikarenakan sampel telah mencapai nilai *Threshold Cycle* (Ct) 22,11 melalui kurva amplifikasi. Adanya

tahap pre-enrichment untuk memperbanyak jumlah bakteri dan mengurangi kesalahan negatif pada pengujian. Hasil tersebut didukung dengan hasil pada pengujian sensori yang dilakukan pada sampel yang positif *Salmonella* sp. didapatkan nilai rata rata sensori sebesar 26,5 dengan kategori *Mid Pass*.

Aktivitas bakteri *Salmonella* sp. dapat mempengaruhi kemunduran mutu ikan karena menguraikan komponen penyusun jaringan tubuh ikan sehingga menghasilkan perubahan fisik. *Salmonella* sp. sangat berbahaya bagi kesehatan manusia, oleh karena itu berdasarkan peraturan yang dikeluarkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (2009), bahan pangan ikan dan produk perikanan tidak boleh mengandung bakteri *Salmonella* sp. dan berdasarkan SNI 7530.1:2009 tentang spesifikasi tuna loin segar, cemaran mikroba jenis *Salmonella* harus negatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada PT Seafood Inspection Laboratory, Denpasar, Bali sebagai tempat dilaksanakan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. (2006). *Tuna loin segar – Bagian 1: Spesifikasi. SNI 7530.1:2006*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. (2015). *Pedoman Pengujian Sensori Pada Produk Perikanan. SNI 2346-2015*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Afrianto, Eddy dan Liviawaty, Evi. (2011). *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius.Yogyakarta.
- CDC. Salmonellosis General Information. 2009. Pada: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonellosis/>. Diakses tanggal 27 Juni 2022.
- Das, Arunava., Hari, Seenivasan Sree., Shalini, Umachandran., Ganeshkumar, Arumugam., dan Karthikeyan, Magudeshwaran. (2012). Molecular Characterisation of Salmonella enterica Serovar Typhi Isolated from Typhoidal Humans. *Malaysian Journal of Microbiology*. 8(3): 148-150.
- Doyle, M.P., And D.O. Cliver. (1990). *Salmonella*, In: *Foodborne Diseases D.O. Cliver (ed)*, Academic Press, Inc., 185-204.
- Laismina, A.N., Montolalu, L.A.D.Y., & Mentang, F. (2014). Kajian Mutu Ikan Tuna (*Thunnus albacares*) Segagar di Pasar Bersehati Kelurahan Calaca Manado. *Jurnal Media teknologi Hasil Perikanan*. 2(2): 15-19.
- Levin, R. E. (2004). The application of real-time PCR to food and agricultural systems: A review. *Food Biotechnology*. 18 (1): 97-133.
- Metusalach, Kasmia, Fahrul, Jaya I. (2014). Pengaruh Transportasi Terhadap Mutu Dan Harga Ikan Dari Pelabuhan Perikanan Pantai Lempasing Ke Daerah Konsumen. *Albacore*. 2(2): 209-219.
- Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. (2006). The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol* 23: 599-604. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.002.
- Nurjanah, Siti., Rahayu, Winiati P., Hariyadi, Ratih Dewanti., Asthiti, Ni Gusti Ayu Made., Melati, Rahardina Praba Melati. (2021). Simpleks dan multiples pre-enrichment-PCR untuk deteksi Salmonella Enteritidis dan Typhimurium pada karkas ayam. *J. Teknol dan Industri Pangan*. 32(2): 148-156.
- Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. Early, Rapid, and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real-Time PCR Application. Dordrecht (NL): Springer.
- Todar, K.. (2005). *Online Textbook of Bacteriology, Science Magazine*, 429-450.
- Vaerman, J.L., P. Saussoy, I. Ingargiola. (2004). Evaluation of Real Time PCR Data. Belgium : Cliniques Saint Luc, Bruxelles.