

DOI: <https://doi.org/10.21009/JRSKT.092.06>

Deteksi Cepat Foodborne Pathogen Bakteri *Cronobacter sakazakii* pada Susu Bubuk Formula dengan Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction

Novi Wulandari¹, Gusti Angieta Putri^{2,*}, Muktiningsih Nurjayadi²

¹ Laboratorium Biomedik Rolabdokkes Pusat Kedokteran dan Kesehatan Polri, Jl. Trunojoyo, Jakarta, 12110, Indonesia

² Prodi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Rawamangun Muka, Rawamangun, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13220, Indonesia

*Email: gustiangieta@gmail.com

Informasi Artikel

Diterima: 09/10/2023

Direvisi: 14/11/2023

Online: 25/12/2023

Edisi: 25/12/2023

Abstrak

Penyakit penyebab keracunan pangan atau foodborne disease masih menjadi persoalan serius yang harus dihadapi oleh masyarakat dunia. Salah satu penyebab foodborne disease adalah kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan. Agen utama mikroorganisme yang menyebabkan keracunan pangan yaitu bakteri. Salah satu bakteri patogen yang banyak mengontaminasi dan penyebab keracunan pangan ialah *Cronobacter sakazakii*. Susu bubuk formula merupakan salah satu sumber pangan yang banyak terkontaminasi oleh bakteri *Cronobacter sakazakii*. *Cronobacter sakazakii* dapat menyebabkan penyakit foodborne disease dengan gejala ringan sampai berat yang dapat mengakibatkan kematian. Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode deteksi yang cepat, sensitif, spesifik, akurat, dan efisien dalam mendeteksi keberadaan *Cronobacter sakazakii* pada susu bubuk formula. Metode real-time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR) merupakan metode biologi molekuler yang dapat digunakan sebagai metode deteksi yang cepat, sensitif, spesifik, akurat, dan efisien untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen pada sampel pangan. Penelitian ini bertujuan dari untuk mendapatkan hasil mengenai uji pendeteksian keberadaan bakteri *Cronobacter sakazakii* secara cepat, sensitif, dan akurat dengan metode real-time Polymerase Chain Reaction pada susu formula.

Kata kunci: *Cronobacter sakazakii*, foodborne diseases, foodborne pathogens, real-time polymerase chain reaction.

Abstract

Diseases that cause food poisoning or foodborne diseases are still a serious problem that must be faced by the world community. One of the causes of foodborne disease is contamination of pathogenic microorganisms in food. The main agents of

microorganisms that cause food poisoning are bacteria. One of the many pathogenic bacteria that contaminate and cause food poisoning is Cronobacter sakazakii Milk powder formula is one of the many food sources contaminated by Cronobacter sakazakii bacteria. Cronobacter sakazakii can cause foodborne disease with mild to severe symptoms that can result in death. Therefore, it is necessary to develop a detection method that is fast, sensitive, specific, accurate, and efficient in detecting the presence of Cronobacter sakazakii in formula milk powder. The real-time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR) method is a molecular biology method that can be used as a fast, sensitive, specific, accurate, and efficient detection method to detect the presence of pathogenic bacteria in food samples. This study aims to obtain results regarding the detection test for the presence of Cronobacter sakazakii bacteria quickly, sensitively, and accurately with the real-time Polymerase Chain Reaction method in formula milk.

Keywords: *foodborne pathogen, foodborne disease, Cronobacter sakazakii, real-time PCR*

Pendahuluan

Makanan merupakan salah satu kebutuhan pokok bagi kehidupan manusia. Makanan yang dikonsumsi wajib memenuhi kriteria yang menyatakan bahwa makanan tersebut layak untuk dimakan dan tidak menimbulkan penyakit, diantaranya adalah makanan berada dalam derajat kematangan yang dikehendaki, makanan bebas dari pencemaran disetiap prosesnya, dan makanan harus bebas dari mikroorganisme patogen yang menimbulkan penyakit (*foodborne disease*). Pangan yang tidak aman dapat menyebabkan penyakit yang disebut dengan *foodborne disease*. *Foodborne disease* merupakan penyakit yang timbul akibat mengonsumsi pangan yang mengandung bahan atau senyawa beracun (intoksikasi) atau akibat kontaminasi mikroorganisme patogen (infeksi) (Srinivasan et al. 2020). Susu merupakan salah satu sumber pangan yang kaya akan nilai gizi. Sebagai bahan pangan alami, susu mengandung tinggi protein, laktosa, mineral, enzim, dan berbagai vitamin lainnya yang baik dikonsumsi untuk semua kalangan (Jiao et al. 2016). Beberapa kandungan mineral yang terdapat dalam susu diantaranya adalah kalsium, boron, potasium, magnesium, mangan, yodium, zat besi, natrium, klorin, kobalt, tembaga, selenium, dan sulfur (Suwito, 2012). Kualitas dan keamanan pangan yang menurun dapat menyebabkan kasus keracunan pangan (*foodborne disease*). Salah satu penyebab keracunan pangan yaitu akibat kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan pangan. Maka dari itu, kualitas dan keamanan pangan sangat penting diperhatikan untuk menjaga kesehatan masyarakat (Chakravarthi dan Naravaneni, 2006).

Menurut PERMENKES No.2 Tahun 2013, kasus keracunan pangan merupakan kejadian yang dialami seseorang ketika mengalami sakit dengan gejala atau tanda keracunan yang disebabkan setelah mengonsumsi makanan yang diduga telah terkontaminasi oleh agen biologis atau kimia (PERMENKES RI, 2013). World Health Organization menyatakan bahwa *foodborne disease* telah menyebabkan lebih dari 600 juta orang mengalami sakit karena keracunan pangan dan 420.000 orang meninggal dunia (Hoffmann dan Scallan, 2017). Mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, dan beberapa parasit lainnya merupakan salah satu penyebab keracunan pangan. Mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan menginfeksi manusia melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi (Dwivedi dan Jaykus, 2011). *Cronobacter sakazakii* adalah salah satu patogen yang menyebabkan keracunan pangan dan menyebabkan infeksi seperti necrotizing enterocolitis, bacteremia, meningitis, dan septicemia dengan angka kematian kasus (case-fatality rate) yang dilaporkan bervariasi dari 40% sampai 80% pada bayi yang terinfeksi (Yan et al. 2012). Susu formula bayi yang terkontaminasi *C. sakazakii* telah dilaporkan menjadi penyebab kasus infeksi yang paling sering terjadi (Bowen dan

Braden, 2006). Walaupun kasus yang terjadi cukup rendah, tetap memberikan dampak yang cukup mematikan untuk bayi yang terinfeksi bakteri tersebut.

Menurut CDC, bayi berusia 2 bulan atau lebih muda kemungkinan besar mengalami meningitis jika mereka terinfeksi *C. sakazakii*. Bayi lain yang mungkin berdampak lebih parah adalah mereka yang lahir prematur dan mereka yang kurang mampu melawan infeksi bakteri karena memiliki suatu penyakit atau sedang dalam perawatan medis, seperti bayi yang menerima kemoterapi untuk kanker (CDC, 2021). Dalam beberapa penelitian dilaporkan bahwa bakteri ini mampu bertahan hidup dalam kondisi kering (Musa et al. 2017; Nurjanah et al. 2017). Dari kemampuan tersebut bakteri *C. sakazakii* dikhawatirkan kontaminasinya terutama pada produk pangan yang dikeringkan salah satunya adalah susu bubuk formula. Oleh karena itu, terdapat kebutuhan mendesak untuk mengembangkan metode yang cepat dan akurat untuk mendeteksi patogen bawaan makanan khususnya dalam mendeteksi *C. sakazakii* pada pangan untuk memastikan keamanan pangan.

Metodologi Penelitian

Metode yang dilakukan merupakan metode eksperimental yang meliputi pembuatan media *Buffered Peptone Water* (BPW), kultur (*enrichment*), ekstraksi DNA, pemeriksaan konsentrasi dan kemurnian menggunakan *Nanodrop spectrophotometer*, dan pendeteksian menggunakan *real-time PCR*.

Pembuatan Media BPW

Media *Buffered Peptone Water* (BPW) dibuat dengan menimbang bubuk BPW sebanyak 1.72 gram dengan neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan 76.5 mL aquadest pada erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil agar tidak terkontaminasi saat dimasukkan ke dalam *autoclave*. *Autoclave* diatur pada suhu 121°C selama 15 menit. Media BPW diambil dari *autoclave* setelah suhunya telah menurun.

Kultur (Enrichment)

Sampel susu formula bubuk ditimbang 8.5 gram dengan neraca analitik. Sampel dilarutkan dengan media BPW sebanyak 76.5 mL yang sebelumnya telah disterilisasi dengan *autoclave*. Langkah ini dinamakan proses *enrichment* atau pengayaan yang berfungsi untuk memperbanyak bakteri yang ada di sampel atau mengurangi tingkat kematian sel bakteri. Selanjutnya, kultur diinkubasi di oven secara *overnight culture* pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam atau satu malam.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA pada sampel susu bubuk formula dilakukan menggunakan **MagMax™MagMax™** DNA Multi-Sample Kit. Pada ekstraksi DNA dibuat dua sampel pada *tube* yang berbeda (duplo). Proses ekstraksi DNA dilakukan sesuai protokol kit.

Pemeriksaan Konsentrasi dan Kemurnian Menggunakan Nanodrop Spectrophotometer

Uji kuantitatif isolat DNA dilakukan dengan mengukur kemurnian dan konsentrasi isolat DNA bakteri menggunakan *Nanodrop Spectrophotometer* sebanyak 2 µL isolat DNA pada panjang gelombang A260/A280. Langkah pertama yang dilakukan adalah meletakkan *Nuclease-free water* pada *sample plate* menggunakan mikropipet. *Nuclease-free water* berfungsi sebagai blanko atau larutan pengoreksi. Selanjutnya, isolat DNA masing-masing dipipet sebanyak 2 µL pada *sample plate*. Nilai konsentrasi dan kemurnian pada masing-masing isolat dapat dilihat melalui layar alat.

Pendeteksian Menggunakan Real-time PCR

Cocktail dilakukan langsung pada *96-well plate* menggunakan mikropipet. Pada kontrol positif, komponen PCR yang perlu disiapkan antara lain 5 µL isolat DNA *template*, 5 µL primer, dan 10 µL *Master Mix*. Komponen kontrol negatif antara lain 20 µL *Master Mix* + NFW. Pada sampel, komponen

PCR yang diperlukan antara lain 5 μL isolat sampel, 5 μL primer, dan 10 μL *Master Mix*. Total dari masing-masing *cocktail* adalah 20 μL campuran. Selanjutnya, dijalankan proses *real-time* PCR sebanyak 40 siklus dengan rincian *initial denaturation* dengan suhu 95°C selama 3 menit, *denaturation* pada suhu 95°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik, *final extension* pada suhu 72°C selama 7 menit, dan *melting curve* analisis pada suhu 95-60°C.

Hasil dan Pembahasan

Media cair yang digunakan berupa *Buffered Peptone Water* (BPW) yang berfungsi sebagai penyedia nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri untuk berkembang biak. Hal ini karena dalam *Buffered Peptone Water* terdiri dari *Enzymatic Digest of Casein* (10 g/l), *Sodium Chloride* (5 g/L), *Disodium Hydrogen Phosphate* (3.5 g/L), dan *Potassium Dihydrogen Phosphate* (1.5 g/L). *Enzymatic Digest of Casein* berperan dalam menyediakan asam amino, nitrogen, karbon, dan mineral yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk berkembang biak. Sedangkan untuk mempertahankan lingkungan yang baik untuk mikroorganisme, *Sodium Chloride* berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan osmotik pada media dan *Phosphate* berfungsi sebagai agen *buffer* (larutan penyangga) (Sembiring et al. 2023). Hasil yang didapatkan dari tahap *enrichment* selama 18 jam ini adalah terbentuknya larutan yang lebih keruh pada sampel susu bubuk formula. Perubahan tingkat kekeruhan pada sampel dan media dapat mengindikasikan terjadinya pertumbuhan bakteri



(a)

(b)

Gambar 1. *Enrichment* Bakteri dalam Sampel Susu Bubuk Formula menggunakan Media BPW: (a) Sampel Susu Bubuk Formula Sebelum Masa Inkubasi, (b) Sampel Susu Bubuk Formula Setelah Masa Inkubasi Selama 18 Jam.

Setelah dilakukan *enrichment*, sampel diekstraksi agar mendapatkan DNA bakteri. Isolat yang dihasilkan diperiksa kemurnian dan konsentrasinya menggunakan *Nanodrop Spectrophotometer* dan menghasilkan data dibawah ini.

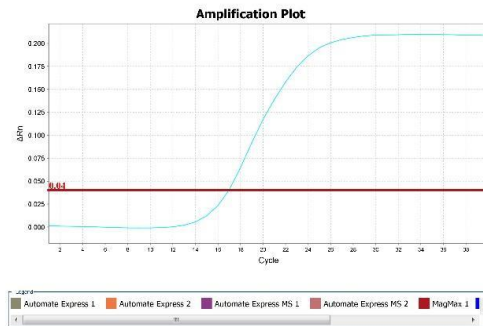
Tabel 1. Hasil *Nanodrop Spectrophotometer*

| Sample | Kit | A260/A280 | Concentration |
|----------|------------------------------|-----------|-----------------------------|
| Sample 1 | MagMax™ | 2.093 | 113 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Sample 2 | MagMax™ DNA Multi-Sample Kit | 2.555 | 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

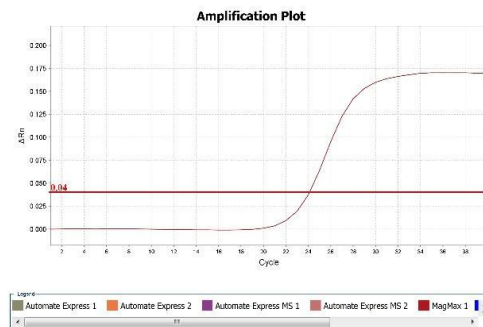
Nanodrop spectrophotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi DNA, RNA, protein, dan kultur sel dengan hanya menggunakan 1 μL sampel. Alat ini memiliki rentang panjang gelombang antara 220 nm hingga 750 nm dengan limit deteksi 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (dsDNA) dan maksimum konsentrasi 3700 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (dsDNA). Kemurnian DNA dapat diukur dengan rasio absorbansi terhadap panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, di mana kemurnian DNA yang baik memiliki rasio 1,8 – 2,0 1,8 – 2,0 (Dewanata dan Mushlih, 2021). Apabila nilai kemurnian yang didapatkan dibawah 1,8, maka hal ini menunjukkan adanya kontaminan protein dalam isolat DNA. Sedangkan jika nilai kemurnian yang didapat berada diatas 2,0, maka hal ini menunjukkan adanya kontaminan RNA pada isolat DNA

(Wasdili dan Gartinah, 2018). Hasil dari pengujian yang didapatkan menggunakan kit MagMax™ dan MagMax™ DNA Multi-Sample telah memiliki rata-rata rasio A260/A280 yang baik, yaitu pada rentang 2,0. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat yang dihasilkan dari penggunaan kedua kit ini sudah memiliki kemurnian yang baik.

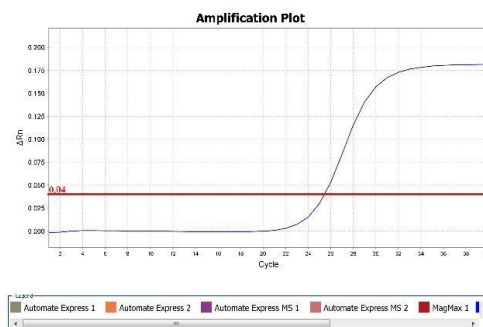
Cronobacter sakazakii dideteksi dari isolat sebelumnya menggunakan *real-time* PCR. Hasil dari *real-time* PCR dapat diamati melalui kurva amplifikasi (*amplification curve*) dan kurva leleh (*melting curve*). Sampel yang dideteksi terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif, sampel susu bubuk formula 1, dan sampel susu bubuk formula 2.



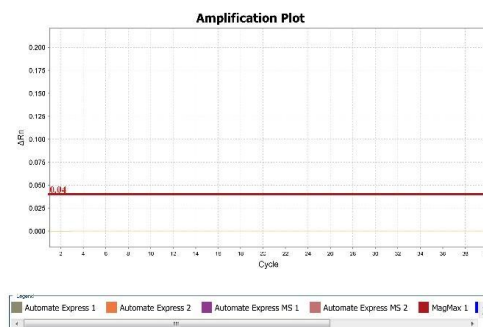
(a)



(b)



(c)

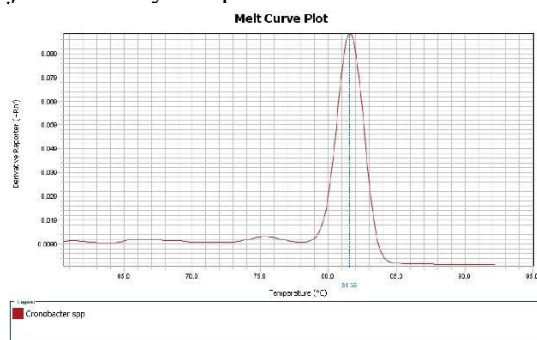


(d)

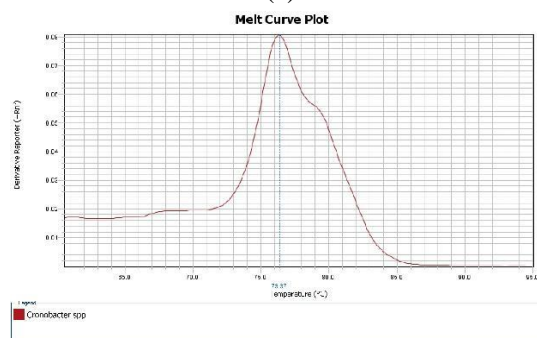
Gambar 2. (a) Kurva Amplifikasi Kontrol Positif, (b) Kurva Amplifikasi Sampel Susu Bubuk Formula 1, (c) Kurva Amplifikasi Sampel Susu Bubuk Formula 2, (d) Kurva Amplifikasi Kontrol Negatif

Berdasarkan data Ct pada kurva amplifikasi, kontrol positif mulai teramplifikasi pada Ct 16 – 18. Sampel susu bubuk formula 1 mulai teramplifikasi pada Ct 24 dan sampel susu bubuk formula 2 mulai teramplifikasi pada Ct 26. Jarak perbedaan siklus antara kontrol positif dengan sampel susu bubuk formula 1 dan 2 berada dalam rentang 8 – 10 siklus. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa pada sampel susu bubuk formula 1 dan 2 terjadi amplifikasi bakteri target karena perbedaan siklus antara kontrol positif tidak lebih dari 10 siklus (Dorak, 2007).

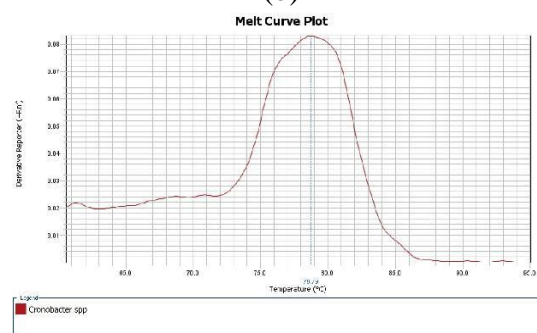
Pada kurva amplifikasi kontrol negatif, garis berada di bawah garis *threshold*. Berdasarkan hal ini, pada kontrol negatif tidak terjadi amplifikasi DNA target dan sesuai dengan hasil yang diinginkan. Kontrol negatif digunakan untuk memastikan tidak adanya kontaminasi. Apabila terjadi kontaminasi kontrol negatif akan menghasilkan data yang positif dan menyebabkan kesalahan interpretasi data. Selain itu, kontrol negatif juga memastikan primer dapat mengenali DNA target saja sehingga kontrol negatif seharusnya tidak menunjukkan adanya amplifikasi.



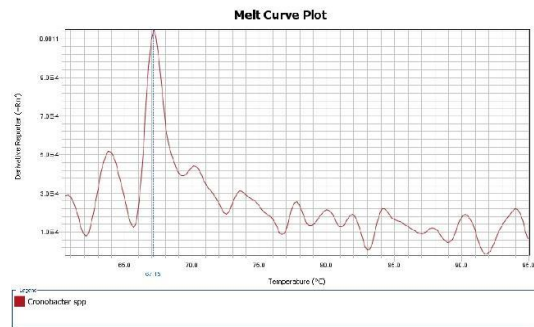
(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 3. (a) Kurva Leleh Kontrol Positif, (b) Kurva Leleh Sampel Susu Bubuk Formula 1, (c) Kurva Leleh Sampel Susu Bubuk Formula 2, (d) Kurva Leleh Kontrol Negatif

Selain kurva amplifikasi, data hasil *real-time* PCR menghasilkan *melting curve* untuk melihat spesifisitas dari hasil amplifikasi. *Melting curve* yang dihasilkan akan dibandingkan dengan *data base* atau data penelitian sebelumnya. Puncak yang muncul pada *melting curve* hanya satu puncak tetapi apabila terdapat dua puncak atau lebih artinya terjadi dimer. Dimer memiliki dua jenis yaitu *self dimer* dan *cross dimer*. *Self dimer* adalah primer berikatan pada primer lain yang sejenis misal daerah *forward* menempel pada daerah *forward*. *Cross dimer* adalah primer berikatan dengan primer lain yang tidak sejenis, daerah *forward* menempel dengan daerah *reverse* (Chakravarthi dan Naravaneni, 2006). *Melting curve* pada sampel susu bubuk formula 1 dan 2 (duplo) menggunakan kit ekstraksi MagMax™ DNA Multi-Sample memiliki nilai T_m 76.37°C (sampel susu bubuk formula 1) dan 78.79°C (sampel susu bubuk formula 2). Kedua *melting curve* hanya menghasilkan satu puncak, hal ini menunjukkan bahwa tidak terjadi dimer pada saat proses amplifikasi DNA dan hanya mengamplifikasi DNA bakteri target. Pada penelitian sebelumnya, *melting curve* isolat murni *Cronobacter sakazakii* adalah 85.72 °C dan 85.81°C.

Kesimpulan

Proses pendeteksian bakteri *Cronobacter sakazakii* pada sampel susu bubuk formula berhasil dilakukan. Ekstraksi DNA bakteri menggunakan MagMax™ dan MagMax™ DNA Multi-Sample, terbukti mampu mengekstraksi DNA bakteri *Cronobacter sakazakii* pada sampel susu bubuk formula. Isolat DNA bakteri *Cronobacter sakazakii* yang dihasilkan dapat teramplifikasi dengan metode *real-time* PCR mulai pada rentang siklus $\pm 16 \pm 16$ dengan nilai *melting temperature* 76.37°C untuk sampel susu bubuk formula 1 dan 78.79°C untuk sampel susu bubuk formula 2.

Daftar Pustaka

- Bowen, AB & Braden, CR. 2006. 'Invasive *Enterobacter sakazakii* Disease in Infants'. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1185, <https://doi.org/10.3201/eid1208.051509>.
- CDC. 2021. 'Cronobacter Infection and Infants'. *Centers for Disease Control and Prevention*. <https://www.cdc.gov/cronobacter/infection-and-infants.html>
- Chakravarthi, BK & Naravaneni, R. 2006. 'SSR Marker Based DNA Fingerprinting and Diversity Study in Rice (*Oryza sativa* L.)'. *African Journal of Biotechnology*, 5(9).
- Dewanata, PA & Mushlih, M. 2021. 'Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients'. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 10-21070, <https://doi.org/10.21070/ijins.v15i.553>.
- Dorak, MT. 2007. 'Real-time PCR'. *Taylor & Francis*, <https://doi.org/10.4324/9780203967317>.

- Dwivedi, HP & Jaykus, LA. 2011. 'Detection of Pathogens in Foods: The Current State-Of-The-Art and Future Directions'. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 40-63, <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>.
- Hoffmann, S., & Scallan, E. 2017. 'Epidemiology, Cost, and Risk Analysis of Foodborne Disease'. *Foodborne Diseases*, 31-63, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00002-4>.
- Jiao, R, Gao, J, Li, Y, Zhang, X, Zhang, M, Ye, Y, Wu, Q & Fan, H. 2016. 'Effects of High-Pressure Processing on the Inactivity of *Cronobacter sakazakii* in Whole Milk and Skim Milk Samples'. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7881-7885, <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11418>.
- Musa, AMA, Dewanti-Hariyadi, R & Syamsir, E. 2017. 'Use of pGFPuv Mutants to Study the Influence of Drying on the Survival of *Cronobacter sakazakii* in Corn'. *The International Journal of Science & Technoledge*, 5(8), 104–111. www.theijst.com
- Nurjanah, S., Sari, R. N., & Dewanti-Hariyadi, R. (2017). Ketahanan dan Kulturabilitas *Cronobacter sakazakii* terhadap Stres Kering pada Simulasi Proses Pengeringan. *Jurnal Mutu Pangan: Indonesian Journal of Food Quality*, 4(2), 92-99.
- PERMENKES RI. 2013. 'Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 2 Tahun 2013'. *Kementrian Kesehatan Republik Indonesia Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia*.
- Sembiring, ER, Terryana, RT, Anggraheni, YGD., Prihaningsih, A, Batubara, I, Nurcholis, W, Ridwan, T, Andini, R Harmoko, R, Rahman, N & Hani, F. 2023. 'Efektivitas Metode Ekstraksi DNA pada Daun Segar dan Kering dari Tanaman Obat'. *Vegetalika*, 12(3), 211-227, <https://doi.org/10.22146/veg.78957>.
- Srinivasan, G, Prabu, M, Pandian, ASS & Varathan, BJ. 2020. 'Food Safety Knowledge, Attitude and Awareness Among Veterinary College Students in India'.
- Suwito, W. 2012. 'Teknologi Penanganan Susu yang Baik dengan Mencermati Profil Mikroba Susu Sapi di Berbagai Daerah'. *Indonesian Journal of Agricultural Postharvest Research*, 9(1), 35-44.
- Wasdili, FAQ & Gartinah, T. 2018. 'Penentuan Kualitas Isolasi DNA Salmonella Typhimurium dengan Metode Spektrofotometri dan Elektroforesis'. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Nasional Penelitian dan Pengabdian Masyarakat I (PINLITAMAS 1)*, 1(1), 578-582.
- Yan, QQ, Condell, O, Power, K, Butler, F, Tall, BD & Fanning, S. 2012. 'Cronobacter Species (Formerly Known as *Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula: A Review of Our Current Understanding of The Biology of This Bacterium'. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 1-15, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x>.