

DOI: <https://doi.org/10.21009/JRSKT.092.03>

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

Novi Wulandari^{1,*}, Ananda Indah Putri Sihombing², 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: noviwulandari.biomedik@gmail.com

Informasi Artikel

Diterima: 10/10/2023

Direvisi: 13/11/2023

Online: 25/12/2023

Edisi: 25/12/2023

Abstrak

Keracunan pangan merupakan masalah yang sangat serius dan berpengaruh besar dalam kehidupan manusia. Keracunan pangan dapat terjadi ketika mikroorganisme patogen atau zat kimia beracun mengkontaminasi pangan dan dikonsumsi oleh makhluk hidup. Mikroorganisme patogen yang dapat mengkontaminasi pangan atau foodborne pathogen salah satunya adalah bakteri Cronobacter sakazakii yang merupakan bakteri gram negatif. Bahaya yang ditimbulkan oleh adanya kontaminasi C. sakazakii menjadi masalah dan tindakan pencegahannya masih sangat minim karena kurang adanya sarana dan prasarana yang memadai. Salah satu pengembangan metode yang dikembangkan adalah real-time PCR. Pada penelitian ini, dilakukan deteksi Cronobacter sakazakii pada susu formula menggunakan real-time PCR yang dikultur pada media cair Buffered Peptone Water (BPW). Cronobacter sakazakii diekstraksi menggunakan kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System. Konsentrasi dan kemurnian isolat diperiksa pada Nanovue spectrophotometer dengan rasio A260/A280 yang menghasilkan konsentrasi sebesar 282 ng/μL dan 88 ng/μL serta kemurnian sebesar 2.153 dan 2.178. Hasil pendeteksian menggunakan rt-PCR direpresentasikan dalam bentuk kurva amplifikasi dan melting curve. Sampel dinyatakan positif terkontaminasi Cronobacter sakazakii pada nilai Ct 22.033 dan Ct 16.732. Melting curve yang dihasilkan memiliki nilai 81.67°C dan 80.95°C.

Kata kunci: Foodborne pathogen, Cronobacter sakazakii, real-time PCR

Abstract

Food poisoning is a very serious problem and has a great influence on human life. Food poisoning can occur when

pathogenic microorganisms or toxic chemicals contaminate food and are consumed by living beings. One of the pathogenic microorganisms that can contaminate food or foodborne pathogens is the Cronobacter sakazakii bacteria which is a gram-negative bacterium. The danger posed by the presence of C. sakazakii contamination is a problem and prevention measures are still very minimal due to the lack of adequate facilities and infrastructure. In this study, detection of Cronobacter sakazakii in infant formula was carried out using real-time PCR cultured on Buffered Peptone Water (BPW) liquid media. Cronobacter sakazakii was extracted using Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System kit. The concentration and purity of the isolate were checked on a Nanovue spectrophotometer with an A260/A280 ratio resulting in concentrations of 282 ng/μL and 88 ng/μL and purities of 2.153 and 2.178. These detection results are represented in the form of an amplification curve and melting curve. Samples tested positive for Cronobacter sakazakii contamination at Ct 22,033 and Ct 16,732. The melting curve of Cronobacter sakazakii in the samples had values of 81.67°C and 80.95°C.

Keywords: Foodborne pathogen, Cronobacter sakazakii, real-time PCR

Pendahuluan

Seiring pertumbuhan jumlah populasi, maka kebutuhan akan pangan semakin meningkat. Dalam pemenuhan kebutuhan pangan ini, tuntutan akan kualitas bahan pangan juga semakin meningkat. Bahan pangan sangat rentan rusak dan terkontaminasi oleh mikroba baik yang bersifat patogen maupun tidak. Jika bahan pangan yang rusak dan terkontaminasi ini dikonsumsi maka akan menimbulkan berbagai macam efek samping seperti penyakit. Penyakit yang timbul dari mengkonsumsi makanan atau minuman yang sudah terkontaminasi oleh patogen dikenal dengan istilah foodborne disease. Penyakit ini merupakan masalah serius yang cukup banyak terjadi di dunia. Data menunjukkan bahwa 7.69% atau setara dengan 600 juta individu dari 7.8 miliar populasi di dunia menderita foodborne disease dan 7.5% atau setara dengan 420 ribu kematian dari 56 juta kematian juga disebabkan karena foodborne disease (Lee dan Yoon, 2021; WHO, 2015).

Di Indonesia kasus foodborne disease ini dikenal dengan istilah Kejadian Luar Biasa Keracunan Pangan (KLB KP). Menurut data dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) tahun 2021, terdapat 50 kasus dengan jumlah yang terpapar 2.569 orang dengan 69.40% atau sebanyak 1.783 orang mengalami gejala sakit. Berdasarkan penyelidikan epidemiologi dan hasil pengujian baik spesimen serta contoh pangan, penyebab kasus KLB KP terbanyak adalah oleh cemaran atau kontaminasi mikroba yaitu bakteri patogen sebanyak 29 dari 50 kejadian (BPOM, 2021). Kejadian ini tidak hanya akan mengakibatkan penderita mengalami gejala sakit tetapi jika tidak ditangani segera akan berujung maut.

Salah satu bakteri patogen yang dapat menimbulkan keracunan pangan adalah Cronobacter sakazakii. Bakteri ini memiliki faktor virulensi yang dapat menyebabkan penyakit baik pada manusia maupun hewan. C. Sakazakii banyak ditemukan pada sejumlah makanan dengan kelembapan rendah, termasuk pada susu bubuk. Bakteri ini mampu menyebabkan morbiditas pada semua kelompok usia, khususnya mempengaruhi neonatus dan bayi (CDC, 2015; Henry dan Fouladkhah, 2019). Bakteri ini dapat menyebabkan komplikasi kesehatan yang mengancam jiwa, seperti meningitis neonatal, infeksi saluran kemih, sepsis, dan kejang (Hunter dan Bean, 2013).

Bakteri patogen ini dapat ditularkan ke manusia melalui konsumsi makanan dan lingkungan. Rute penularan C. sakazakii yang paling umum adalah melalui susu formula yang terkontaminasi dari wadah

terbuka, baik di rumah atau di tempat pengolahan susu tersebut (Braun dan Hammer, 2011). Selain itu, *C. sakazakii* dapat bertahan hidup dalam kondisi yang sangat kering dan banyak mencemari berbagai permukaan, termasuk meja dapur, wastafel, dan air. *C. sakazakii* telah diteliti lebih resisten terhadap kekeringan dibandingkan *E.coli*, *Salmonella*, dan *Enterobacteriaceae* lainnya dan dapat bertahan dalam kondisi kering lebih dari 2 tahun (Breeuwer, 2023 ; Osaili dan Forsythe, 2009).

Bahaya yang ditimbulkan oleh adanya kontaminasi *C. sakazakii* menjadi masalah dan tindakan pencegahannya masih sangat minim karena kurang adanya sarana dan prasarana yang memadai. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi bakteri patogen ini, seperti menggunakan metode kultur (Budiarso dan Winarni, 2016) dan PCR konvensional (Chen et al. 2013). Namun kedua metode ini memiliki beberapa kekurangan seperti diperlukannya waktu analisis yang cukup lama untuk memperoleh hasil dan memerlukan ketelitian yang tinggi. Maka diperlukan metode deteksi bakteri patogen *C. sakazakii* yang cepat, akurat, sensitif, spesifik, dan terjangkau untuk memastikan keamanan pangan. Salah satu pengembangan metode yang dikembangkan adalah *real-time Polymerase Chain Reaction* atau rt-PCR. Prinsip dasar dari metode ini adalah adanya hasil pengamatan secara langsung produksi fluoresensi hasil amplifikasi DNA (Widayat et al. 2019).

Metodologi Penelitian

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

Pembuatan Media BPW

Pembuatan media Buffered Peptone Water (BPW) dilakukan dengan mencampurkan bubuk BPW sebanyak 1.72 gram dengan 76.5 mL akuades pada erlenmeyer. Media yang telah dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditutup rapat dengan aluminium foil untuk mencegahnya kontaminasi dan masuknya udara. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan dimasukkan ke dalam autoklaf. Autoklaf diatur pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah suhu menurun, media BPW diambil dari dalam autoklaf.

Peremajaan Kultur (*Enrichment*)

Bakteri pada sampel diperbanyak dengan dilakukan peremajaan kultur atau enrichment. Langkah ini berfungsi untuk memperbanyak bakteri dalam sampel atau dapat juga mengurangi tingkat kematian sel bakteri. Proses peremajaan kultur dilakukan dengan membiakkan sampel susu bubuk formula pada media cair Buffered Peptone Water (BPW) dengan perbandingan 1:10. Sampel susu formula sebanyak 8.5 gram dilarutkan dalam 76.5 mL media BPW yang sebelumnya telah disterilisasi dengan autoklaf. Lalu kultur diinkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam atau dapat disebut overnight cultures. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan yang terjadi pada media yang telah diinkubasi.

Ekstraksi DNA

Proses Ekstraksi DNA pada sampel susu bubuk formula dilakukan menggunakan kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System. 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

Pada pemeriksaan konsentrasi dan kemurniaan menggunakan *nanodrop spectrophotometer* digunakan *Nuclease-free water* (NFW) yang berfungsi sebagai blangko atau larutan pengoreksi. Setelah 2 µL larutan pengoreksi diletakkan pada *sample plate* dan diuji, selanjutnya isolat DNA masing-masing dipipet sebanyak 2 µL pada *sample plate*. Setiap pergantian uji isolat, *sample plate*

dibersihkan dengan lap bebas serabut. Nilai konsentrasi dan kemurnian pada masing-masing isolat dapat dibaca melalui layar alat.

Pendeteksian Menggunakan *real-time* PCR

Langkah pertama dalam melakukan pendeteksian menggunakan *real-time* PCR adalah menyiapkan cocktail. Proses penyiapan cocktail dilakukan langsung pada 96-well plate menggunakan mikropipet. Pada kontrol positif, komponen PCR yang perlu disiapkan antara lain 5 μ L isolat DNA template, 5 μ L primer, dan 10 μ L Master Mix. Komponen kontrol negatif antara lain 20 μ L Master Mix + NFW. Pada sampel, komponen PCR yang diperlukan antara lain 5 μ L isolat sampel, 5 μ L primer, dan 10 μ L Master Mix. Total dari masing-masing cocktail adalah 20 μ L campuran. Pada tiap well, dipastikan tidak ada gelembung. Lalu well plate disegel dengan optical adhesive film.

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 pendeteksian ini direpresentasikan dalam bentuk kurva amplifikasi dan melting curve.

Hasil dan Pembahasan

Dalam mendeteksi *Cronobacter sakazakii* dilakukan enrichment atau peremajaan kultur yang bertujuan untuk memperkaya sel bakteri agar dapat tumbuh dan bisa terdeteksi. Setelah sampel diinkubasi selama semalam dalam media cair Buffered Peptone Water (BPW), sampel terlihat lebih keruh dari sebelum diinkubasi (Gambar 1). Kekeruhan pada sampel dan media menandakan adanya pertumbuhan bakteri (Kabense et al. 2019). Media BPW termasuk media non selektif yang luas penggunaannya untuk media kultur (Yeni dan Hamdi, 2023). Dalam berbagai penelitian, *Cronobacter sakazakii* telah terbukti dapat tumbuh dalam media BPW (Bai et al. 2019; Fakruddin et al. 2014). Komposisi yang ada di dalam BPW mendukung pertumbuhan bakteri yang ada di sampel susu bubuk formula. Komposisi BPW 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 akan menyediakan asam amino, nitrogen, karbon, dan mineral. Sodium Chloride berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan osmotik pada media. Phosphate berfungsi sebagai agen buffer (larutan penyangga) (Yeni dan Hamdi, 2023).



(a)



(b)

Gambar 1. Hasil Inkubasi Sampel Susu dengan Media BPW. (a). Sebelum *overnight cultures*; (b). Setelah *overnight cultures*

Hasil kultur yang sudah terindikasi adanya pertumbuhan bakteri kemudian dilakukan isolasi serta ekstraksi DNA untuk mendapatkan DNA bakteri. Untuk pengujian kuantitatif isolat DNA digunakan *Nanodrop Spectrophotometer* yang akan mengukur absorbansi pada panjang gelombang A260/A280 secara otomatis dan akan memberikan informasi kemurnian sampel serta konsentrasi DNA yang

didapatkan. Dilakukan analisis dengan volume kecil (1-2 μ L). Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang A260/A280 karena pada panjang gelombang 260nm adalah gelombang maksimum yang diserap oleh DNA dan pada panjang gelombang ini terjadi resonansi pada struktur purin dan pirimidin dari basa nukleotida. Pada panjang gelombang 280nm adalah panjang gelombang maksimum yang diserap oleh protein, dimana asam amino aromatik (triptofan, tirosin, dan sistein) mengalami resonansi sehingga terjadi delokalisasi elektron (Anthis dan Clore, 2013). Jika nilai kemurnian lebih dari 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA sedangkan nilai dibawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminan protein pada isolat tersebut (Abdel-Latif dan Osman, 2017; Lucena-Aguilar et al. 2019). Hasil yang didapatkan dari pengukuran kemurnian dengan rasio A260/A280 pada kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System bernilai rata-rata 2. Berdasarkan penelitian sebelumnya, konsentrasi DNA minimum yang direkomendasikan untuk proses PCR adalah 50 ng/ μ L (Nurjayadi et al. 2019). Sehingga dapat disimpulkan, hasil uji kualitatif isolat DNA untuk sampel sudah berada pada rentang nilai baik. Hasil pemeriksaan isolat dengan *Nanodrop spectrophotometer* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1. Hasil *Nanodrop Spectrophotometer* Isolat DNA

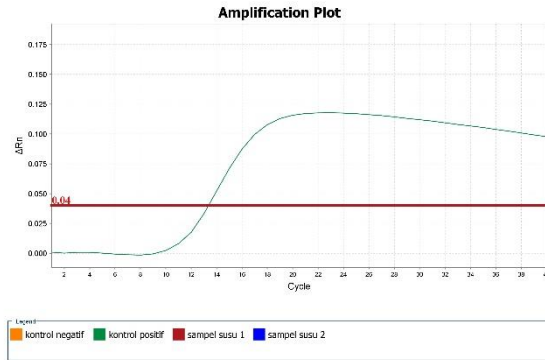
Sampel	Jenis Kit	A260/A280	Konsentrasi
Sampel 1	Viogene® MiniPlus Plasmid DNA	2.153	282 ng/ μ L
Sampel 2	Extraction System	2.178	88ng/ μ L μ g/mL

Selanjutnya dilakukan pengujian deteksi menggunakan *real-time Polymerase Chain Reaction* (rt-PCR). Digunakan sampel susu yang sudah diekstraksi sebelumnya. Pada deteksi ini digunakan Master Diagnostic real-time PCR Detection Kit. Metode rt-PCR merupakan amplifikasi DNA dan hasil amplifikasi nya dapat diamati saat reaksi berlangsung karena fluoresensi yang dihasilkan dapat dideteksi kamera. Pewarna fluoresen yang digunakan biasanya adalah zat yang memiliki kemampuan untuk memancarkan cahaya yang gelombangnya lebih panjang daripada cahaya datang seperti SYBR Green (Lobert et al. 2010). SYBR Green adalah pewarna pengikat dsDNA yang berinterkalasi di antara basa DNA. Saat SYBR Green sudah terinterkalasi dengan untai ganda DNA maka akan berpendar. Pewarna ini akan tereksitasi dengan cahaya biru pada panjang gelombang 480nm (Wangler dan Bellen, 2017).

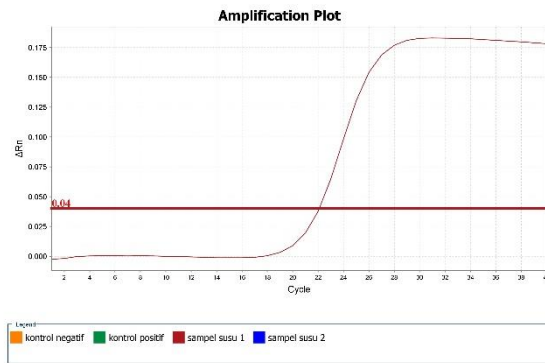
Dalam percobaan kontrol positif digunakan untuk memverifikasi bahwa semua reagen bekerja, kondisi berjalan optimum, dan tidak terdapatnya inhibitor PCR dalam percobaan serta diinterpretasikan sebagai *true positive*, Kontrol negatif adalah reaksi tanpa amplifikasi dan diinterpretasikan sebagai *true negative*. Reaksi ini memverifikasi apakah ada kontaminasi dalam campuran dan tidak adanya terbentuk primer-dimer (Luo et al. 2021; Moldovan dan Moldovan, 2020). Hasil pendeteksian ini direpresentasikan dalam bentuk kurva amplifikasi. Pembacaan dilakukan dengan melihat nilai *cycle threshold* (Ct) dari proses rt-PCR. Ct adalah siklus awal di mana amplifikasi terdeteksi terlebih dahulu melebihi ambang batas detektor. Dimana pada siklus awal fluoresensi terlalu rendah dibedakan dari *background*. Ct juga dapat didefinisikan sebagai titik di mana intensitas fluoresensi meningkat di atas tingkat yang dapat dideteksi (*baseline*) secara proporsional dengan jumlah awal molekul DNA dalam sampel. Semakin tinggi konsentrasi DNA target dalam sampel maka semakin rendah nilai Ct. Hal ini karena semakin banyak DNA target mengakibatkan ampikon terbentuk lebih banyak, dan membutuhkan siklus yang lebih sedikit untuk fluoresen melewati batas deteksi. Begitupun ketika DNA yang digunakan memiliki konsentrasi yang kecil, maka Ct akan bergeser ke arah kanan kurva (Kralik dan Ricchi, 2017; Campbell dan Wright, 2003).

Pada pengujian deteksi dengan kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System didapatkan threshold pada $\Delta Rn = 0.04$. Nilai ambang batas ini sudah *setting protocol* dari instrumen AppliedBiosystem real-time PCR. Berdasarkan kurva amplifikasi, kontrol positif mulai teramplifikasi pada siklus rentang 13.353 (Gambar 2a). Sampel susu 1 mulai teramplifikasi pada siklus 22.033 (Gambar 2b) dan sampel susu 2 mulai teramplifikasi pada Ct 16.732 (Gambar 2c). Untuk kurva kontrol negatif, garis berada di bawah garis *threshold* (Gambar 2d). Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan pada sampel susu 1 dan 2 adanya amplifikasi bakteri target dan positif terkontaminasi bakteri *Cronobacter sakazakii* karena perbedaan jumlah rentang siklus tidak lebih dari 10 siklus dengan

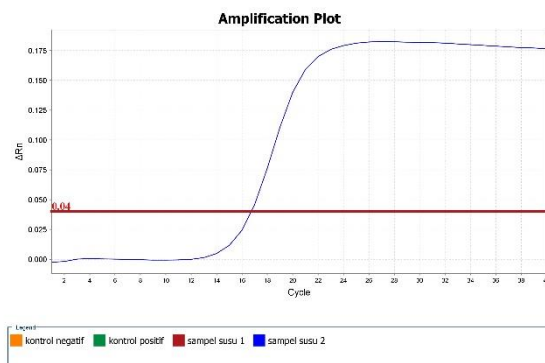
kontrol positif (Dorak, 2006). Sedangkan untuk kontrol negatif tidak terjadinya amplifikasi DNA target dan sesuai dengan hasil yang diinginkan. Kurva amplifikasi dapat dilihat pada gambar berikut ini:



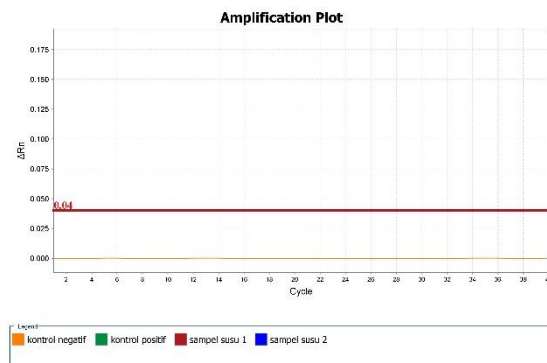
(a)



(b)



(c)

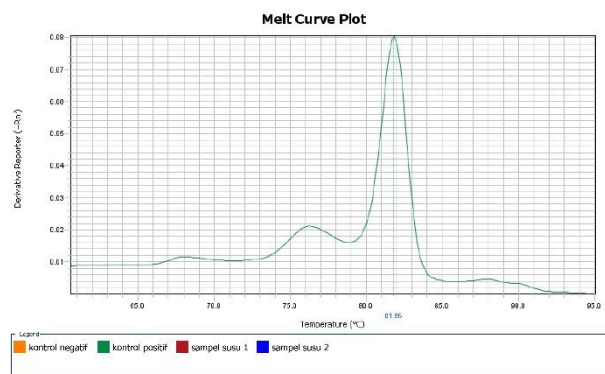


(d)

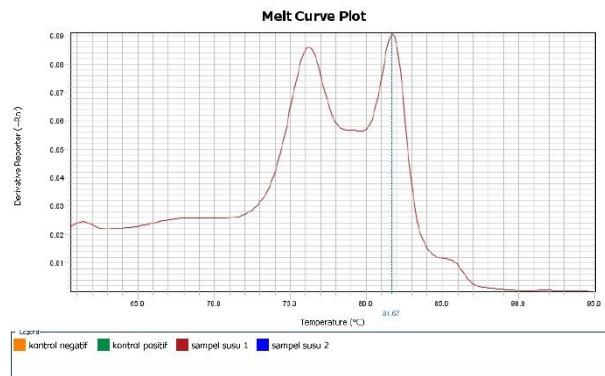
Gambar 2. Hasil Kurva Amplifikasi. (a).Kontrol Positif; (b).Sampel Susu 1; (c).Sampel Susu 2; (d).Kontrol Negatif

Didapatkan juga data hasil *real-time* PCR berupa *melting curve*. Kurva ini menunjukkan spesifisitas produk atau sampel yang diuji dari hasil amplifikasi. *Melting curve* yang dihasilkan akan dibandingkan dengan *database* 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* (Sasmito et al. 2014).

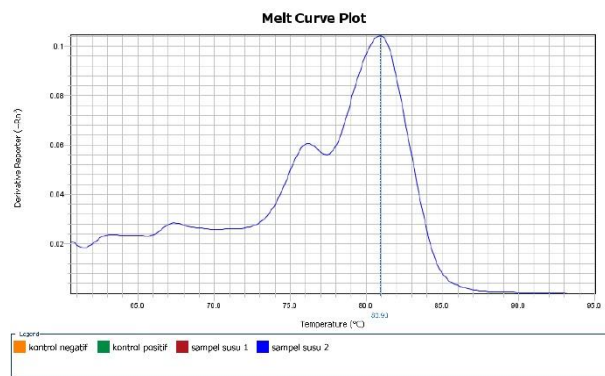
Melting curve kontrol positif terdapat pada nilai 81.86°C (Gambar 3a). *Melting curve* sampel *duplo* kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System, berada pada nilai 81.67°C untuk sampel susu 1 yang memiliki dua puncak (Gambar 3b) dan 80.95°C untuk sampel susu 2 (Gambar 3c). Untuk *melting curve* kontrol negatif terdapat *multiple peak* (Gambar 3d). Pada *melting curve* untuk sampel susu 1 muncul dua puncak yang mengartikan terjadi dimer pada saat amplifikasi DNA. *Melting curve* dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



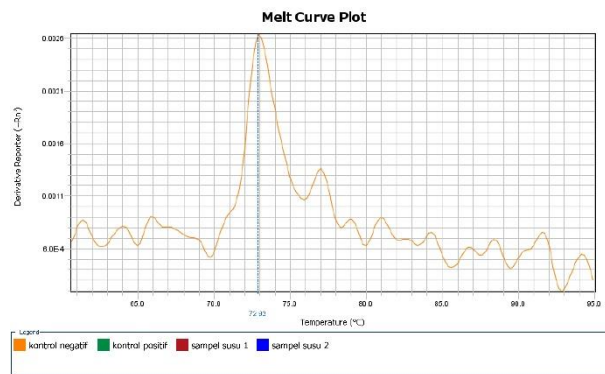
(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 3. Hasil *Melting Curve*. (a).Kontrol Positif; (b).Sampel Susu 1; (c).Sampel Susu 2; (d).Kontrol Negatif

Kesimpulan

Hasil ekstraksi kit Viogene® MiniPlus Plasmid DNA Extraction System mampu mengekstraksi DNA *Cronobacter sakazakii* dari sampel susu bubuk formula dengan konsentrasi dan kemurnian yaitu kemurnian sebesar 2.153 dan 2.178 juga konsentrasi sebesar 282 ng/μL dan 88 ng/μL. Isolat tersebut diamplifikasi menggunakan *real-time* PCR untuk mengetahui keberadaan *C. sakazakii*. Hasil amplifikasi diinterpretasikan pada kurva amplifikasi dan sampel dinyatakan positif terkontaminasi *Cronobacter sakazakii* pada nilai Ct 22.033 dan Ct 16.732. *Melting curve* *C. sakazakii* pada sampel

memiliki nilai 81.67°C dan 80.95°C. Berdasarkan percobaan ini, maka metode *real-time* PCR baik digunakan untuk mendeteksi bakteri *Cronobacter sakazakii* pada susu formula.

Daftar Pustaka

- Abdel-Latif, A & Osman, G 2017, 'Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize'. *Plant methods*, 13, 1-9, <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>.
- Anthis, NJ & Clore, GM 2013, 'Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm'. *Protein Science*, 22(6), 851-858, <https://doi.org/10.1002/pro.2253>.
- Bai, Y, Yu, H, Guo, D, Fei, S, & Shi, C 2019, 'Survival and environmental stress resistance of *Cronobacter sakazakii* exposed to vacuum or air packaging and stored at different temperatures'. *Frontiers in Microbiology*, 10, 303, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00303>.
- BPOM 2021, 'Laporan Tahunan Badan POM Tahun 2020'. 131-132.
- Braun, CJP & Hammer, P 2011, 'Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder producing plant'. *Journal of dairy science*, 94(8), 3801-3810, <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4318>.
- Breeuwer, P, Lardeau, A, Peterz, M & Joosten, H 2023, 'Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter*'. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 967-973, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x>.
- Budiarso, TY & Winarni, HCS 2016, 'Isolasi dan Identifikasi *Enterobacter sakazakii*'. *Jurnal Sain Veteran*, 34(2), <https://doi.org/10.22146/jsv.27565>.
- Campbell, MS & Wright, AC 2003, 'Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters'. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7137-7144, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7137-7144.2003>.
- CDC, 'Cronobacter: Expanded Information'.
- Chen, W, Ai, L, Yang, J, Ren, J, Li, Y & Guo, B, 2013, 'Development of a PCR assay for rapid detection of *Cronobacter* spp. from food'. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(10), pp. 656-661, <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0243>.
- Dorak, M 2006, 'Real-time PCR', 1 ed., London, <https://doi.org/10.4324/9780203967317>.
- Fakruddin, M, Rahaman, M, Ahmed, MM & Hoque, MM 2014, 'Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food'. *Biological research*, 47, 1-12, <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-63>.
- Henry, M & Fouladkhah, A 2019, 'Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings'. *Microorganisms*, 7(3), 77, <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030077>.
- Hunter, CJ & Bean JF 2013, 'Cronobacter: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis'. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, 33, 581-585, <https://doi.org/10.1038/jp.2013.26>.
- Kabense, R, Ginting, EL, Wullur, S, Kawung, NJ, Losung, F & Tombokan, JL 2019, 'Penapisan Bakteri Proteolitik yang Bersimbiosis dengan Alga *Gracillaria* sp'. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2), 413-418, <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/platax413>.
- Kralik, P & Ricchi, M 2017, 'A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything'. *Frontiers in microbiology*, 8, 239909, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>.
- Lee, H & Yoon Y 2021, 'Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide'. *Food science of animal resources*, 40(1), 1-7, <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e75>.

- Lobert, S, Hiser, L & Correia, JJ 2010, 'Expression profiling of tubulin isotypes and microtubule-interacting proteins using real-time polymerase chain reaction'. *Methods in cell biology*, 95, 47-58, [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)95004-8](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)95004-8).
- Lucena-Aguilar, G, Sánchez-López, AM, Barberán-Aceituno, C, Carrillo-Avila, JA, López-Guerrero, JA & Aguilar-Quesada, R 2016, 'DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis'. *Biopreservation and biobanking*, 14(4), 264-270, <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>.
- Luo, G, Zhang, J, Zhang, S, Hu, B, Hu, L & Huang, Z 2021, 'High-quality RT-PCR with chemically modified RNA controls'. *Talanta*, 224, 121850, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121850>.
- Moldovan, E & Moldovan, V 2020, 'Controls in real-time polymerase chain reaction based techniques'. *Acta Marisensis-Seria Medica*, 66(3), 79-82, 10.2478/amma-2020-0025.
- Nurjayadi, M, Pertiwi, YP, Islami, N, Azizah, N, Efrianti, UR, Saamia, V & El-Enshasye, HA 2019, 'Detection of the Salmonella typhi bacteria in contaminated egg using real-time PCR to develop rapid detection of food poisoning bacteria'. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 20, 101214, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101214>.
- Osaili, T & Forsythe, S 2009, 'Desiccation resistance and persistence of Cronobacter species in infant'. *Int J Food Microbiol International*, 136(2), pp. 214-220, 31 December 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>.
- Sasmito, DEK, Kurniawan, R dan Muhimmah, I 2014, 'Karakteristik primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review'. In *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)* 93-102.
- Wangler, MF & Bellen, HJ 2017, 'In vivo animal modeling: Drosophila. In Basic Science Methods for Clinical Researchers'. *Academic Press*, 211-234, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00012-6>.
- W. H. O. [WHO] 2015, 'WHO estimates of the global burden of foodborne diseases'. 2-73.
- Widayat, W, Agustini, TW, Suzery, M, Al-Baarri, ANM, Putri, SR & Kurdianto, K 2019, 'Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) sebagai alat deteksi DNA babi dalam beberapa produk non-pangan'. *Indonesia Journal of Halal*, 2(1), 26-33, <https://doi.org/10.14710/halal.v2i1.5361v>.
- Yeni, T & Hamdi 2023, 'Analisa Mikrobiologi Menggunakan Nacl sebagai Bahan Alternatif Buffer Peptone Water pada Produk Desiccated Coconut di Pt. Unicoco Industries Indonesia,' *Jurnal Agroindustri Pangan*, 2(1), 88-104.