

# Ketahanan dan Kulturabilitas *Cronobacter Sakazakii* terhadap Stres Kering pada Simulasi Proses Pengeringan

## *Survival of Cronobacter sakazakii on Dry Stress by Dessiccation Process*

Siti Nurjanah<sup>1,2)\*</sup>, Ratna Nurmalita Sari<sup>1)</sup>, Ratih Dewanti-Hariyadi<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2)</sup> South East Asian Food and Agricultural Science and Technology Center, Institut Pertanian Bogor, Bogor

**Abstract.** *Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen that has been isolated from several dried food products and reported can survive in dry conditions. Survival on dry stress can be observed using microscopy due to losses of their culturability in the medium. This study aimed to observe the survival and culturability of *C. sakazakii* on dry stress and ability to recover their culturability or resuscitation. This research was carried out in 3 steps: drying cells by desiccation, survival cell enumeration, and resuscitation. The bacteria used were two isolates Green fluorescence protein (pGFPuv) mutants of *C. sakazakii*, namely E2 and Yrt2a, that have ampicillin resistance and similar growth pattern with their wild-type. Desiccation was conducted by placed bacterial cells in incubator at 30, 35, 40<sup>o</sup> and 50<sup>o</sup>C for 2 hours and air-drying stored at 21<sup>o</sup>C for 72 hours. The culture able cells were enumerated on tryptone soy agar (TSA) and total cells include non-culturable cells were enumerated using fluorescence microscopy. Both of *C. sakazakii* isolates can survive for all of treatment. Total cells of E2 and Yrt2a decreased 2-3 and 4-5 log cells respectively. Both of isolates loss their ability to grow on medium, however supplementation the medium growth using pyruvate can resuscitate their cells and recover their culturability. Resuscitation of *C. sakazakii* cells might be as potential risk for increasing bacterial contaminant in food.

**Keywords:** *Cronobacter sakazakii*, culturability, drying, resuscitation, survival

**Abstrak.** *Cronobacter sakazakii* adalah bakteri patogen oportunistik yang telah diisolasi pada beberapa bahan pangan kering dan dilaporkan memiliki kemampuan bertahan pada kondisi kering. Ketahanan pada stres kering dapat diamati dengan mikroskopik karena sel kehilangan kemampuan untuk dikulturkan (kulturabilitas) pada media. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ketahanan dan kulturabilitas sel *C. sakazakii* terhadap stres kering dan kemampuan untuk dikulturkan kembali. Penelitian terdiri dari tiga tahap yaitu perlakuan pengeringan dengan proses desikasi, penghitungan jumlah sel *survive*, dan resusitasi sel. Digunakan dua isolat mutan *C. sakazakii* E2 dan Yrt2a, yang mengandung fluoresens gen (pGFPuv), resisten ampisilin dan memiliki pola pertumbuhan serupa dengan galur normalnya. Desikasi dilakukan dengan menempatkan 10<sup>7</sup> CFU/mL sel di dasar cawan petri tanpa medium pada inkubator suhu 30, 35, 40 dan 50°C selama 2 jam dan disimpan pada suhu 21°C selama 72 jam dalam udara kering. Jumlah sel hidup dihitung dengan media TSA (SPC) dan menggunakan mikroskop fluoresens (DMC). Kedua isolat terutama E2 mampu bertahan pada semua suhu pengeringan dan penyimpanan kering. Nilai DMC E2 dan Yrt2a masing-masing menurun sebesar 2-3 log sel dan 4-5 log sel. Kedua isolat kehilangan kemampuan untuk dikulturkan, tetapi proses resusitasi sel dengan suplementasi natrium piruvat 0.1% pada medium tumbuh menyebabkan sel tersebut dapat dikulturkan kembali di media TSA. Kemampuan resusitasi ini menunjukkan adanya risiko meningkatnya jumlah cemaran pada produk pangan.

**Kata Kunci:** *Cronobacter sakazakii*, ketahanan, kulturabilitas, pengeringan, resusitasi

**Aplikasi Praktis:** Adanya informasi mengenai kemampuan bakteri yang dapat bertahan pada proses pengeringan dengan kondisi *unculturable* dapat menjadi masukan bagi industri pangan agar dapat melakukan analisis keberadaan bakteri tersebut dengan metode yang tepat, yaitu metode yang mampu menganalisis sel *unculturable* atau melakukan resusitasi terlebih dahulu sehingga keberadaannya dapat terdeteksi. Kemampuan resusitasi ini menunjukkan adanya potensi risiko meningkatnya jumlah cemaran dalam produk pangan.

## PENDAHULUAN

Pengeringan pangan merupakan proses mengurangi kadar air yang dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme, sehingga pangan memiliki umur simpan yang lebih panjang. Hingga saat ini pengeringan merupakan metode yang paling digunakan pada skala besar untuk menyimpan pangan padat pada periode waktu lama (Majumdar dan Chen 2009). Namun, laporan-laporan terakhir menyebutkan beberapa bakteri memiliki ketahanan terhadap pengeringan, salah satunya adalah *C. sakazakii*. Di Indonesia *Cronobacter* spp. juga berhasil diisolasi dari pangan lokal hasil pengeringan antara lain tepung jagung, susu formula, makanan bayi, bubuk coklat, maizena, dan tepung hunkue (Dewanti *et al.* 2012; Gitapratwi *et al.* 2012; Estuningsih *et al.* 2006; Meutia *et al.* 2008).

*C. sakazakii* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, bersifat motil, tidak dapat membentuk spora, dan bersifat fakultatif anaerob (Iversen dan Forsythe 2004). Golongan paling beresiko untuk terinfeksi bakteri ini adalah bayi yang lahir dengan berat badan kurang, bayi prematur, bayi yang mempunyai penurunan sistem imun, dan bayi dari ibu yang menderita HIV (WHO 2008). Beberapa kasus yang disebabkan oleh *C. sakazakii* antara lain *necrotizing enterocolitis* (NEC), meningitis, dan *bacterimia* pada bayi melalui konsumsi susu formula (Iversen dan Forsythe 2004). Bakteri ini merupakan salah satu anggota dari *Enterobacteriaceae* yang paling tahan terhadap panas. Penelitian-penelitian terakhir menunjukkan ketahanannya terhadap proses pengeringan pada berbagai produk (Sulistiyanti 2013; Musa 2015). Selain itu bakteri ini juga dapat bertahan terhadap stres osmotik, bahkan dapat meningkatkan fase lag pada penurunan  $a_w$  (Dancer *et al.* 2009). Berdasarkan karakteristik tersebut *C. sakazakii* dikhawatirkan keberadaannya terlebih pada pangan yang dikeringkan. Menurut Breeuwer *et al.* (2003) *C. sakazakii* toleran terhadap stres akibat desikasi dan panas.

Kondisi stres lingkungan dapat menyebabkan menurunnya kemampuan bakteri untuk dikulturkan (kulturabilitas) pada media, sehingga memasuki kondisi yang tidak dapat dikulturkan (*unculturable*). Kondisi ini ditandai dengan hilangnya kemampuan untuk tumbuh pada media yang biasa digunakan untuk mendeteksi secara konvensional namun masih tetap melakukan aktivitas metabolismenya (Li *et al.* 2014). Beberapa penelitian menunjukkan keadaan tersebut pada bakteri seperti *Escherichia coli* pada air sungai (Liu *et al.* 2008) dan *Listeria monocytogenes* karena beberapa kondisi stres (Besnard *et al.* 2002). Beberapa bakteri yang memasuki tahap tersebut dapat bersifat *reversible* atau dapat memiliki kemampuan untuk dapat dikulturkan kembali saat stres dihilangkan. Transisi sel *unculturable* menjadi dapat dikulturkan disebut dengan resusitasi (Pinto *et al.* 2013). Beberapa bakteri yang stres dapat diresusitasi dengan berbagai macam metode salah satunya adalah pemberian komponen spesifik dan media

yang kaya nutrisi. Kondisi *unculturable* terutama untuk bakteri patogen dapat merugikan bagi produsen pangan. Kerugian yang mungkin terjadi adalah tidak terdeteksinya bakteri pada media normal sehingga saat melalui tahap *quality control* produk dapat lolos namun pada saat stres dihilangkan bakteri dapat kembali ke tahap normal (Du *et al.* 2007), selain peralatan industri yang kontak dengan produk juga dapat memberikan kontaminasi pada produk akhir.

Berdasarkan permasalahan tersebut penelitian ini akan mempelajari ketahanan dan kulturabilitas sel *C. sakazakii* pada stres kering dan kemampuannya beresitasi atau dikulturkan kembali. Untuk mempermudah metode pengamatan maka digunakan isolat mutan *green fluorescence protein C. sakazakii* yang memiliki karakter dapat berpendar dibawah lampu UV sehingga dapat diamati langsung di bawah mikroskop fluoresens (Nurjanah 2014). Adanya penggunaan isolat mutan akan mempermudah pendeteksian sel VBNC dengan metode *direct microscopic count* (DMC). Penelitian ini merupakan penelitian awal, dilakukan cara simulasi pengeringan sederhana dengan proses desikasi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Kultur bakteri yang digunakan adalah isolat mutan pGFPuv *C. sakazakii* YRt2a (JF800181) dan isolat mutan *C. sakazakii* E2 (Nurjanah 2014) yang mengandung *green fluorescence protein*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *buffer peptone water* (BPW,OXOID), *brain heart infusion* (BHI,Difco) *broth*, *tryptone soy agar* (TSA,OXOID),  $\text{CaCl}_2$ , alginat, N-heksametrafosfat, larutan ampisilin, natrium piruvat (SIGMA), akuades dan minyak imersi.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator suhu 30, 35, 40 dan 50°C cawan petri steril, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, alat swab, mikro pipet dan tip, gelas piala, tabung erlenmeyer, 0.22  $\mu\text{m}$  *pore size membrane filter*, kertas saring, *epifluorescence microscope* (Olympus CH30), lampu UV, gelas preparat, dan *cover slip* 18 mm.

### Konfirmasi viabilitas dan kemampuan fluoresensi koloni *C. sakazakii*

Tahapan konfirmasi isolat mengacu pada metode Nurjanah (2014). Tahapan konfirmasi isolat dilakukan dengan memindahkan isolat mutan YRt2a dan E2 ke dalam medium BHI dengan ampisilin 100  $\mu\text{g/mL}$ , kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi kemudian digores ke dalam medium TSA yang telah ditambahkan ampisilin 100  $\mu\text{g/mL}$  atau (TSAA) kemudian diinkubasi 37°C 24 jam. Koloni diamati di bawah lampu UV dengan hasil positif berwarna hijau berfluoresens.

Isolat ditumbuhkan dalam BHI *broth* kemudian selama 16 jam pada 37°C sehingga mencapai fase akhir eksponensial dengan konsentrasi  $10^8$ – $10^9$  CFU/mL (Nurjanah 2014).

### Penentuan media enumerasi untuk sel *Culturable*

Isolat mutan mengandung gen resisten ampisilin sehingga mampu bertahan di medium yang mengandung ampisilin. Media enumerasi dipilih yang optimum memperlihatkan pertumbuhan antara medium TSA atau medium TSAA, yaitu TSA yang telah ditambahkan ampisilin 100 µg/mL.

### Simulasi pengeringan dengan proses desikasi

Proses pengeringan pangan disimulasi dengan menggunakan inkubator sebagai oven pengering dan penyimpanan di desikator. Kultur yang dipersiapkan sebelumnya kemudian diencerkan 100 kali menggunakan BPW sehingga jumlah sel diperkirakan  $10^7$  CFU/mL dan sebanyak 30 µL dari suspensi diletakkan ke gelas preparat dalam cawan petri steril yang telah dipetak dalam ukuran 1 cm<sup>2</sup>. Pengeringan dilakukan dengan cawan terbuka pada inkubator dengan suhu yang diberikan adalah 30, 35, 40, dan 50°C. Setelah perlakuan selama 2 jam cawan kembali ditutup kemudian disimpan pada suhu 21°C selama 72 jam di dalam wadah yang diberi silika gel di dalamnya agar udara tetap kering (Shaker *et al.* 2008).

### Perhitungan sel *culturable* dan *unculturable*

Perhitungan total sel dihitung dengan mikroskop fluoresens dengan metode *direct microscopic count* (DMC) pada masing-masing preparat pada setiap perlakuan suhu pengeringan dan hari penyimpanan. Dihitung juga jumlah sel awal sebelum perlakuan sebagai kontrol. Metode DMC dilakukan dengan mengamati secara langsung gelas objek yang telah diinkubasi di bawah mikroskop fluoresens. Sel berpendar dihitung sebanyak 10 bidang pandang kemudian jumlah organisme per mL dihitung dengan rumus sebagai berikut (Yousef dan Carlstrom 2003):

$$\text{Jumlah } \frac{\text{sel}}{\text{mL}} = \frac{100}{\pi r^2} \times \text{rata-rata jumlah bakteri perbidang pandang}$$

Perhitungan sel *culturable* dilakukan dengan metode cawan sebar pada media TSA dengan metode *standard plate count* (SPC). Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *swab* menggunakan kapas steril yang telah dicelupkan dalam alginat dan CaCl<sub>2</sub> setelah gelas preparat diamati di bawah mikroskop.

Kemudian hasil *swab* dimasukkan ke dalam campuran larutan BPW 9 mL dan 1 mL Na-heksa-metafosfat. Suspensi tersebut dianggap sebagai pengenceran ke-0. Tahap perhitungan sel dilakukan dengan mengambil 1 mL suspensi sampel yang ada pada BPW dan dicawakan dengan metode sebar ke media TSA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sel *viable* dapat dihitung dibawah lampu UV menggunakan *standard plate count* (Larry 2001). Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$N = \frac{\text{jumlah koloni pada cawan}}{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) + (0,01 \times n_3) \times d}$$

dimana, N = total bakteri (CFU/mL); n1 = jumlah koloni pada cawan pengenceran pertama; n2 = jumlah koloni pada cawan pengenceran kedua; n3 = jumlah koloni pada cawan pengenceran ketiga; d = pengenceran pertama yang dihitung.

### Resusitasi sel

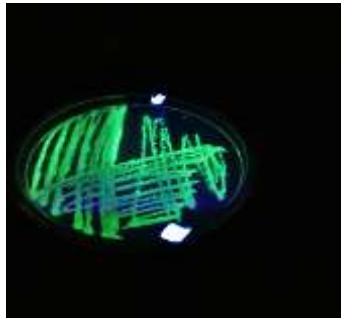
Tahapan resusitasi merupakan tahapan yang memiliki prinsip yang sama dengan proses pengeringan pada pangan. Resusitasi yang dilakukan mengacu pada resusitasi padat Mizunoe *et al.* (2000) yang dimodifikasi. Natrium piruvat (Sigma, USA) ditambahkan sebanyak 0.1% pada media TSA kemudian diautoklaf. Media kemudian dituangkan ke dalam cawan steril. Isolat yang telah diberi perlakuan dan menghasilkan positif VBNC tanpa pengenceran dicawakan menggunakan TSA+ Na-piruvat (TSAP) dan TSAA + Na piruvat (TSAAP) dengan metode sebar, diinkubasi 37°C selama 24 jam. Perlakuan resusitasi dilakukan dengan perlakuan kontrol menggunakan TSA dan TSAA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Viabilitas dan fluoresensi koloni *C. sakazakii* mutan

Tahapan ini berfungsi untuk mengetahui morfologi koloni mutan *C. sakazakii* serta mempersiapkan dan mengkonfirmasi isolat untuk diberikan perlakuan selanjutnya. Mutan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mutan *C. sakazakii* yang telah disisipi GFPuv sehingga memiliki karakteristik koloni dapat berpendar di bawah lampu UV dan sel dapat diamati secara langsung di bawah mikroskop fluoresens. Isolat yang digunakan adalah *C. sakazakii* mutan YRt2a (Nurjanah *et al.* 2014) yang diisolasi dari susu formula (Meutia *et al.* 2008). Isolat kedua yang digunakan adalah *C. sakazakii* mutan E2 (Silitonga 2016) yang diisolasi dari MP-ASI (Estuningsih *et al.* 2006). Isolat YRt2a merupakan isolat dengan aktivitas sitotoksik rendah, sedangkan isolat E2 memiliki aktivitas sitotoksik tinggi (Nurjanah 2014). Koloni yang telah dikonfirmasi dapat diamati dengan menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm setelah dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam setelah dilakukan penggoresan (Gambar 1). Isolat mutan E2 dan YRt2a bersifat stabil. Ekspresi pGFPuv dikatakan stabil jika semua koloni isolat menghasilkan fluoresen atau pendaran hijau (Silitonga 2016).

Koloni yang telah dikonfirmasi tersebut selanjutnya dipersiapkan dalam media BHI mengandung ampisilin 100 µg/mL dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Hasil dari persiapan tersebut kemudian dipupuk kedalam media TSA mengandung ampisilin kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C untuk mengetahui densitas bakteri. Isolat E2 memiliki densitas  $10^8$  CFU/mL sedangkan isolat YRt2a memiliki densitas  $10^9$  CFU/mL. Jumlah tersebut sesuai dengan Nurjanah (2014), yang menyatakan bahwa kepadatan sel setelah inkubasi 16 jam sebesar  $10^8$ - $10^9$  CFU/mL.



**Gambar 1.** Konfirmasi isolat *C. sakazakii* pGFPuv di bawah lampu UV

### Metode dan media perhitungan sel *culturable*

Kemampuan sel untuk dikulturkan dihitung menggunakan metode *standard plate count* (SPC) (Larry 2001). SPC merupakan metode standar penghitungan bakteri yang dapat dikulturkan (Talaro *et al.* 2002). Metode SPC dilakukan sebelum perlakuan, setelah pengeringan selama 2 jam, serta pada pengamatan jam ke-24, 48, dan 72 pada masing-masing isolat. Isolat perlakuan pada objek gelas di-*swab* menggunakan alat *swab* yang ujungnya berupa kapas. Kapas tersebut telah dilapisi dengan alginat dan  $\text{CaCl}_2$ . Fungsi alginat adalah sebagai penjerap sehingga bakteri pada permukaan dapat diangkat. Senyawa  $\text{CaCl}_2$  berfungsi membentuk struktur gel pada alginat, sehingga alginat menempel pada permukaan kapas. Isolat perlakuan yang telah di-*swab* secara aseptis kemudian dicelupkan pada BPW + N-heksametafosfat selanjutnya divorteks. Penambahan N-heksametafosfat berfungsi dalam melepaskan jerapan alginat, sehingga bakteri dapat bercampur dengan BPW. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL dan disebar pada cawan berisi TSA dan TSAA. Hasil SPC dihitung di bawah lampu UV (Gambar 2). Penggunaan dua media dalam plating digunakan untuk mengetahui perbedaan kemampuan untuk dikulturkan isolat dengan keberadaan ampisilin.

TSAA merupakan media selektif dari isolat mutan *C. sakazakii*. Mutan *C. sakazakii* yang digunakan merupakan bakteri yang memiliki resistensi genetik terhadap ampisilin. Faktor yang menentukan sifat resistensi bakteri terhadap ampisilin terdapat pada elemen yang bersifat genetik yaitu gen penyandi enzim  $\beta$ -laktamase. Enzim ini mampu menghidrolisis ampisilin, sehingga adanya ampisilin tidak mengganggu pembentukan ikatan silang pada dinding sel bakteri (Haddix *et al.* 2000). Sedangkan TSA merupakan media non-selektif atau media umum, sehingga sel yang mungkin terluka selama induksi dapat memperbaiki diri, sehingga setelah inkubasi sel masih memiliki kemampuan untuk dikulturkan.

Perbedaan media yang digunakan untuk menguji kemampuan dikulturkan menunjukkan bahwa kedua strain tidak dapat tumbuh optimum pada medium yang diperkaya ampisilin (TSAA). Kedua strain menunjukkan jumlah koloni yang lebih banyak pada medium TSA. Dalam pendeteksian kemampuan untuk dikulturkan perlu digunakan media kaya nutrisi tanpa adanya

tambahan stres karena beberapa sel mengalami luka selama desikasi sehingga memungkinkan gagalnya pertumbuhan pada media selektif. Berdasarkan data tersebut maka dalam pendeteksian mutan *C. sakazakii* digunakan media TSA sebagai indikator kemampuannya untuk dikulturkan.

Penghitungan jumlah sel dilakukan paralel dengan menghitung total sel menggunakan metode DMC di bawah mikroskop fluoresens dan sel *culturable* dengan metode cawan sebar. Keuntungan dari penggunaan mikroskop fluoresen adalah sensitif, spesifik, dan hasilnya dapat diketahui secara cepat (Sardessai *et al.* 2005; Oliver 2005).



**Gambar 2.** Hasil pengamatan koloni *C. sakazakii* pGFPuv di bawah lampu UV

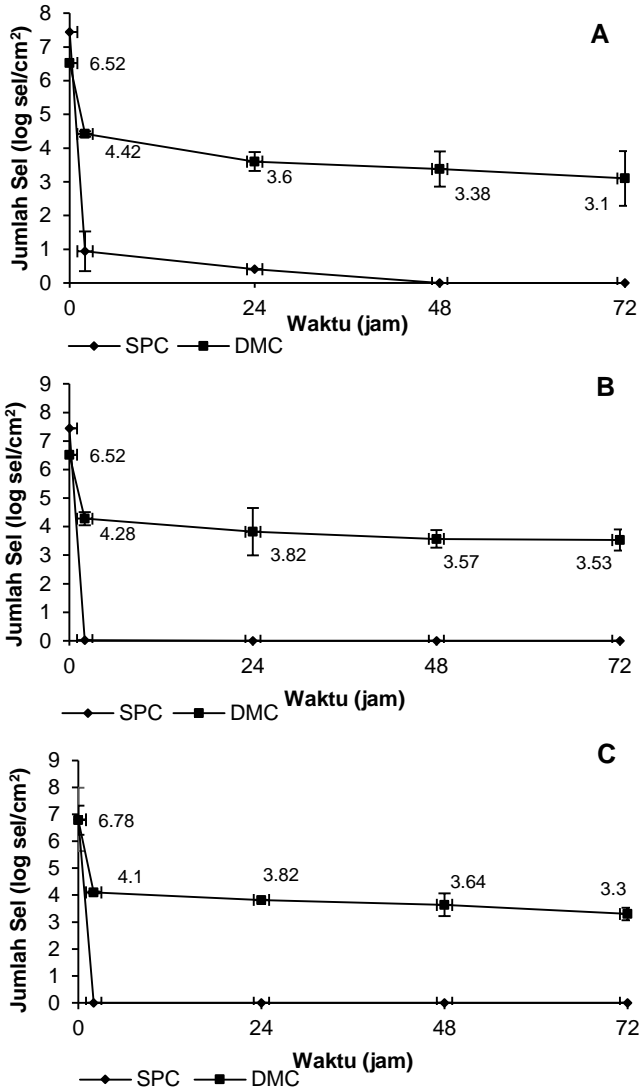
### Ketahanan dan kulturabilitas sel *C. sakazakii* pada proses pengeringan

Isolat E2 memperlihatkan ketahanan selama proses pengeringan, walaupun mengalami penurunan dibandingkan dengan jumlah awal yang ditambahkan (Gambar 3). Berdasarkan grafik tersebut isolat E2 relatif konstan dengan bentuk kurva yang lebih landai pada DMC. Penurunan total sel sebesar 2-3 log yang ditunjukkan metode DMC. Namun, proses pengeringan ini menyebabkan kemampuan sel untuk tumbuh (kulturabilitas) menjadi menurun, yaitu penurunan sejumlah 6-7 log ditunjukkan oleh hitungan SPC, bahkan pada pengeringan di atas suhu 35°C, semua sel sudah tidak dapat dideteksi dengan metode kultur cawan ini.

Isolat YRt2a juga memperlihatkan ketahanan selama proses pengeringan (Gambar 4), walaupun mengalami penurunan lebih banyak dibandingkan dengan penurunan pada isolate E2. Penurunan total sel sebesar 4-5 log yang ditunjukkan metode DMC. Penurunan kulturabilitas akibat proses pengeringan juga ditunjukkan oleh isolate Yrt2a dengan profil yang sama dengan E2, yaitu penurunan sejumlah 6-7 log dan pada pengeringan di atas suhu 35°C, semua sel sudah tidak dapat dideteksi.

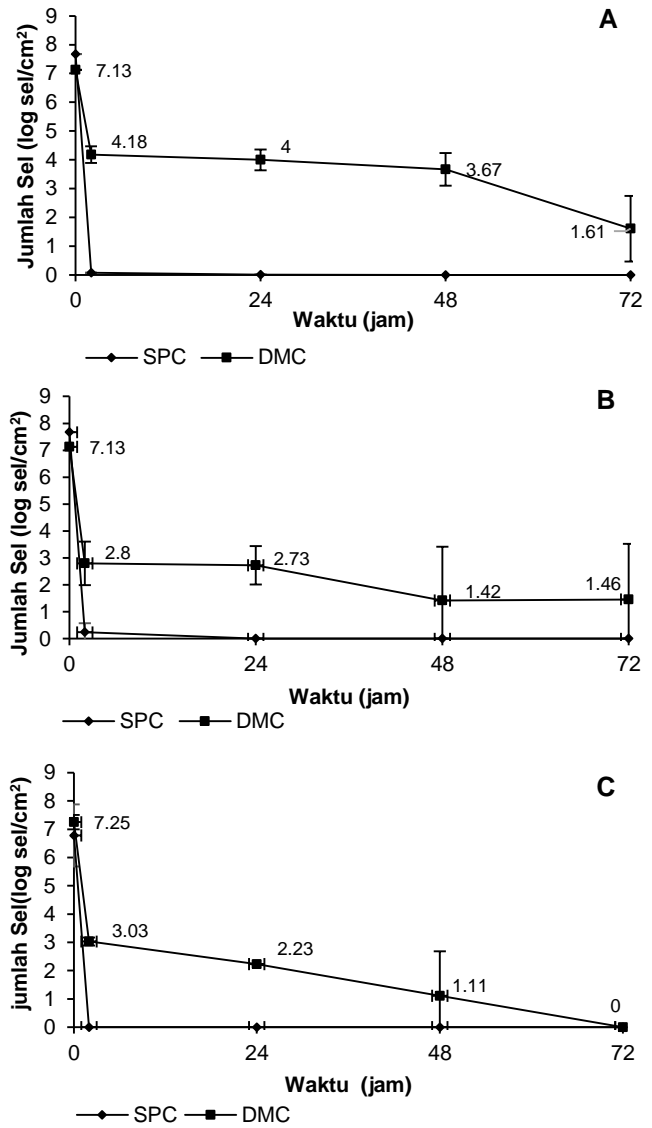
Perbandingan hasil DMC menunjukkan bahwa isolat E2 lebih stabil dibandingkan dengan YRt2a. Penurunan pada isolat YRt2a lebih besar dikarenakan isolat YRt2a merupakan isolat yang diisolasi dari susu formula. Susu formula merupakan produk yang dikeringkan menggunakan pengeringan semprot pada suhu yang tinggi (160-170°C) tetapi dengan waktu yang singkat yaitu sekitar 1-2 detik sehingga paparan panas

yang diterima YRt2a lebih singkat (Nurjanah 2014). Isolat YRt2a diisolasi dari makanan pendamping ASI (MP-ASI). Pengeringan MP-ASI menggunakan pengering kabinet suhu 50-55°C selama 2 jam (Listyoningrum dan Harijono 2015), sehingga paparan panas yang diterima E2 lebih panjang dibandingkan dengan YRt2a. Hal tersebut yang menyebabkan isolat YRt2a memiliki kurva yang lebih curam dan E2 lebih landai.



Gambar 3. Hasil SPC dan DMC isolat E2 (a) Suhu 30°C (b) Suhu 35°C (c) Suhu 40°C

Desikasi mampu menurunkan kulturabilitas dari *C. sakazakii*. Hal yang sama dilaporkan juga untuk *Sinorhizobium meliloti* (Vriezen *et al.* 2012) dan *Enterobacter cloacae* (Pederson dan Jacobsen 1993). Waktu yang singkat sesuai dengan Shaker *et al.* (2008) induksi stres menggunakan desikasi yang diberikan pada *C. sakazakii* dalam *rehydrated infant milk formula* menurunkan *C. sakazakii* dengan waktu paling singkat dibandingkan dengan stres kekurangan nutrisi (*starvation*), stres panas, dan stres dingin.



Gambar 4. Hasil SPC dan DMC isolat YRt2a (a) Suhu 30°C (b) Suhu 35°C (c) Suhu 40°C

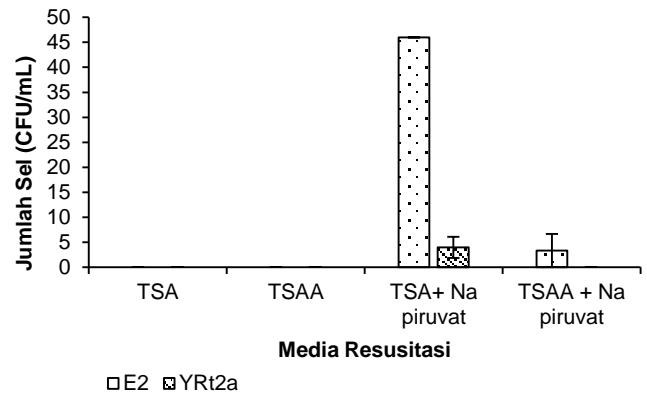
**Kemampuan *C. sakazakii* Dikulturkan Kembali**

Resusitasi merupakan tahap perubahan dari tidak dapat dikulturkan menjadi dapat dikulturkan kembali. Adanya kemampuan resusitasi dari bakteri setelah perlakuan dapat menjadi gambaran adanya potensi tumbuhnya kembali bakteri pada bahan pangan setelah diberikan perlakuan pengeringan. Masing-masing bakteri memiliki stimulus resusitasi yang berbeda seperti peningkatan suhu, peningkatan nutrisi, dan keberadaan *resuscitation promoting factor*. Salah satu senyawa yang memicu terjadinya resusitasi adalah natrium piruvat. Natrium piruvat merupakan senyawa yang dapat mendegradasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan secara efisien meresusitasi *Vibrio parahaemolyticus* pada media yang disuplementasi (Mizunoe *et al.* 2000). Sementara Beuchat *et al.* (2009) telah membandingkan media agar untuk meresusitasi *C. sakazakii* yang telah terpapar stres panas, beku, basa, dan desikasi. Penelitian tersebut menggunakan TSA yang disuplementasi dengan piruvat 0.1% (TSAP). Media TSAP menunjukkan adanya jumlah koloni terbanyak pada resusitasi sel yang terpapar stres.

Waktu resusitasi pada sel bakteri bervariasi. Masing-masing bakteri dengan induksi yang berbeda memiliki waktu spesifik dalam beresitasi. Waktu resusitasi ini disebut sebagai *resuscitation window* yang spesifik bagi masing-masing bakteri. Belum ada penelitian yang dapat membedakan sel yang benar-benar diresusitasi atau sel merupakan sel normal. Sehingga waktu yang tepat untuk melakukan resusitasi adalah pada saat tidak ada koloni yang tumbuh pada media (Downing *et al.* 2005). Tahapan akhir penelitian ini adalah menguji kemampuan resusitasi dari sel *unculturable C. sakazakii* yang telah diinduksi dengan desikasi.

Isolat *C. sakazakii* yang telah diberikan perlakuan suhu 40°C ditumbuhkan pada cawan dengan media TSAP dan sebagai pembandingan dilakukan pula pencawanan pada media TSAAP. Sebagai kontrol dilakukan *plating* pada media TSA ataupun TSAA (Gambar 5). Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa kontrol sudah menunjukkan tidak ada koloni yang terbentuk baik pada media TSA maupun pada media TSAA, artinya seluruh sel telah kehilangan kulturabilitasnya. Sel yang telah diberi perlakuan tersebut kemudian dicawankan pada media yang disuplementasi piruvat. Hasil pada media TSAP yaitu media tanpa penambahan ampisilin menunjukkan kemampuan untuk dikulturkan kembali baik pada isolat E2 maupun YRt2a. Isolat E2 mampu kembali ke tahap dikulturkan sebanyak  $4.6 \times 10^1$  CFU/mL sedangkan isolat YRt2a memiliki jumlah yang lebih rendah yaitu  $4.0 \times 10^0$  CFU/mL. Natrium piruvat mampu mengembalikan *C. sakazakii* dari tahap VBNC ke tahap dapat dikulturkan, senyawa ini merupakan antioksidan yang dapat menetralkan atau mencegah pembentukan ROS seperti  $H_2O_2$  dalam media. Selain itu Na-piruvat ditambahkan ke dalam media berfungsi sebagai sumber karbohidrat dimana sel dapat dengan mudah mendapatkan energi. Pada *L. monocytogenes* piruvat 0.1% dapat mengembalikan sel ke tahap dapat dikulturkan setelah mendapatkan stres desikasi (Sally dan Dickson 2004).

Penggunaan antibiotik yaitu ampisilin pada resusitasi menyebabkan tingkat resusitasi yang lebih rendah pada isolat E2 dan tidak berhasil meresusitasi YRt2a. Isolat E2 yang mampu diresusitasi sejumlah  $3.4 \times 10^0$  CFU/mL. Isolat YRt2a yang hanya mampu diresusitasi dalam jumlah yang rendah oleh TSAP menjadi tidak dapat diresusitasi pada TSAAP. Adanya ampisilin diduga memiliki efek menghambat dalam resusitasi. Studi Lleo *et al.* (1998) menggunakan konsentrasi antibiotik rendah untuk membunuh sel yang mampu dikulturkan. Penggunaan antibiotik tidak direkomendasikan seperti pada *E. faecalis* adanya antibiotik menghambat terjadinya resusitasi dengan memengaruhi biosintesis dinding sel (Lleo *et al.* 2007). Penelitian Sally dan Dickson (2004) juga menunjukkan media non-selektif menunjukkan adanya hasil resusitasi yang lebih baik dibandingkan dengan media selektif pada *L. monocytogenes*.



Gambar 5. Hasil resusitasi menggunakan Na-piruvat

## KESIMPULAN

*C. sakazakii* isolate E2 dan Yrt2a mempunyai ketahanan terhadap proses pengeringan (suhu 30, 35, 40, dan 50°C) dan selama penyimpanan kering sampai 72 jam. Isolat E2 lebih tahan kering dibandingkan dengan Yrt2a. Kedua isolat tersebut mengalami penurunan kulturabilitas bahkan tidak dapat dideteksi lagi pada akhir semua perlakuan. Penambahan natrium piruvat pada media TSA mampu meresusitasi kedua isolat *C. sakazakii* kembali dapat dikulturkan. Kemampuan resusitasi ini menunjukkan adanya potensi risiko meningkatnya jumlah cemaran.

## DAFTAR PUSTAKA

- Besnard V, Frederigh M, Declerq E, Jugiau F, Coppelier J. 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state *Listeria monocytogenes*. *J Vet Res* 33: 395 – 370. DOI: 10.1051/vetres:2002022.
- Beuchat L, Kim H, Gutler J, Lin L, Ryu J, Glenner, Richards. 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *J Food Microbiol* 136: 204 – 213. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.
- Breeuwer P, Lardeau A, Joosten H. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl Microbiol* 95: 967–973. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x.
- Dancer G, Mah J, Rhee S, Hwang I, Kang D. 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* to environmental stresses. *J Appl Microbiol* 107: 1606–1614. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04347.x.
- Dewanti-Hariyadi R, Larasati F, Nuraida L. 2012. Survival of *Cronobacter sakazakii* in skim milk during spray drying storage and resuscitation. *J Teknol Industri Pangan* 13: 186-192. DOI: 10.6066/jtip.2012.23.2.186.

- Downing K, Mischenko V, Shleeva, Young D, Young M, Kaprelyants A. 2005. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and resuscitation in vitro. *J Infect Immun* 73: 3038–3043. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3038-3043.2005.
- Du M, Chen J, Zhang X, Li A, Wang Y. 2007. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl Environ Microbiol* 73: 1349–1354. DOI: 10.1128/AEM.02243-06.
- Estuningsih S, Kress C, Hassan A, Akinden O, Schneider E, Usleber E. 2006. Cronobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *J Food Prot* 69(12): 3013–3017. DOI: 10.4315/0362-028X-69.12.3013.
- Gitapratwi D, Dewanti-Hariyadi R, Hidayat SH. 2012. Genetic relatedness of *Cronobacter* spp isolated from dried food product in Indonesia. *J Int Food Res* 17(4): 1745-1749.
- Haddix P, Paulsen E, Werner T. 2000. Measurement of mutation to antibiotic resistance: ampicillin resistance in *Serratia marcescens*: *J Bioscience* 26 (1): 17–21.
- Iversen C, Forsythe S. 2004. Isolation *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant milk and related products. *J Food Microbiol* 21: 771–777. DOI: 10.1016/j.fm.2004.01.009.
- Larry M, James TP. 2001. BAM: Chapter 3: Aerobic plate count. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>. [5 Desember 2015].
- Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver J, Faucher S. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers Microbiol* 5(258): 1–20. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00258.
- Listyoningrum H, Harijono. 2015. Optimasi susu bubuk dalam makanan pendamping ASI. *J Pang Agr* 3(4): 1302–1312.
- Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li F. 2008. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. *Appl Environ Microbiol* 74(5): 1502–1507. DOI: 10.1128/AEM.02125-07.
- Lleo M, Tafi M, Canepari P. 1998. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growths. *J Syst Appl Microbiol* 21: 333–339. DOI: 10.1016/S0723-2020(98)80041-6.
- Lleo M, Benedetti, Tafi D, Signoretto C, Canepari P. 2007. Inhibition of resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *J Environ Microbiol* 9: 2313–2320. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x.
- Majumdar SA, Chen XD. 2009. *Drying Technologies in Food Processing*. New Jersey (US): Blackwell Publishing.
- Meutia YR, Dewanti R, Estuningsih S. 2008. *Enterobacter sakazakii* Isolate Asal Susu Formula dan Makanan Bayi: Karakterisasi Gen 16s rRNA dan Perilaku Bakteri Pasca Rekonstitusi. [Desertasi]. Bogor, IPB.
- Mizunoe Y, Wai A, Takade A, Yoshida S. 2000. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEM Microbiol Letters* 186(2000): 115–120. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09091.x.
- Musa AMA. 2015. Using pGFP Mutants to Study the Influence of Drying on the Survival of *Cronobacter sakazakii* in Maize. [Thesis]. Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Nurjanah S. 2014. Sitotoksitas dan Pelabelan *Cronobacter sakazakii* dengan Green Fluorescent Protein untuk Mempelajari Perilakunya selama Pengerangan Jagung. [Desertasi]. Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Oliver J. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43(1): 93–100.
- Pederson J, Jacobsen C. 1993. Fate of *Enterobacter cloacae* JP210 and AEO106 (pRo101) in soil during water stress: Effect on culturability and viability. *J Appl Environ Microbiol* 59(5): 1560–1564.
- Pinto D, Santos M, Chambel. 2013. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanism. *Crit Rev Microbiol* 41(1): 61-76. DOI: 10.3109/1040841X.2013.794127.
- Sally C, Dickson J. 2004. Survival and recovery of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells in a nutritionally depletion. *J Food Prot* 67(8): 1641–1645. DOI: 10.4315/0362-028X-67.8.1641.
- Sardesai Y. 2005. The viable but nonculturable bacteria: their impact on public health. *J Curr Sci* 89(10): 1650.
- Shaker R, Osaili A, Hasan A, Ayyash M, Forsythe S. 2008. Effect of desiccation, starvation, heat, and cold stresses on the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. *J Food Sci* 73(7): 354–359. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00880.x.

- Silitonga YW. 2016. Resistensi *Cronobacter sakazakii* terhadap Ampisilin dan Hubungannya dengan Stabilitas Ekspresi GFPuv. [Thesis]. Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Sulistiyanti ST. 2013. Kajian Pembuatan Maizena dari Jagung Kuning dan Sintas Mutan *Cronobacter* spp. Selama Pembuatan Maizena. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Vriezen J, Bruijn F, Nusslein K. 2012. Dessication induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express* 2(6): 1–9. DOI: 10.1186/2191-0855-2-6.
- [WHO]. 2008. *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganism in Powdered Infant Formula. Microbiol Risk Asses. WHO, Geneva, Switzerland.
- Yousef AE, Carlstrom C. 2003. *Food Microbiology A Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- 
- JMP-03-17-16-Naskah diterima untuk ditelaah pada 20 Maret 2017. Revisi makalah disetujui untuk dipublikasi pada 18 Juli 2017. Versi Online: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/jmpi>