

## SINTASAN *Cronobacter sakazakii* pGFPuv SELAMA PENYIMPANAN JAGUNG PIPILAN BERKADAR AIR AWAL BERBEDA DI BERBAGAI RH

[Survival of *Cronobacter sakazakii* pGFPuv on Corn Kernels with Different Initial Moisture Content during Storage at Various RH]

Karina Nola Sinamo<sup>1)</sup>, Suliantari<sup>2,3)</sup>, dan Ratih Dewanti-Hariyadi<sup>2,3)\*</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

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

<sup>3)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 11 Agustus 2016 / Disetujui 30 November 2016

### ABSTRACT

*Cronobacter sakazakii* is an opportunistic foodborne pathogen reported to cause necrotizing enterocolitis, bacteremia, and meningitis in certain groups of infant. *C. sakazakii* has been reported to survive at low  $a_w$  or dryness. Presence of wild-type *C. sakazakii* in dry product is difficult to be distinguished from naturally occurring *C. sakazakii*. A pGFPuv mutant of *C. sakazakii* has been reported to have similar growth pattern, thus has the potential to be used in further investigation. The study aimed to evaluate the effect of initial moisture content and relative humidity (RH) on the survival rate of *C. sakazakii* pGFPuv in corn kernels during storage at room temperature. The study consists of drying corn kernels to achieve moisture contents of 12 and 16% (w.b), inoculation of *C. sakazakii* pGFPuv, and storage at RH 50, 70 and 90% for 12 weeks. Every two week, corn kernels were sampled and the moisture content was measured using oven method, water activity was measured with  $a_w$  meter, and total *C. sakazakii* pGFPuv was enumerated by spread plate method. Meanwhile, total bacteria, mold and yeast were enumerated by pour plate method. Corn kernels achieved equilibrium moisture content and  $a_w$  after two weeks of storage. The number of *C. sakazakii* decreased rapidly during storage at RH 70 and 90%, however they could survived at RH 50% for 12 weeks, especially when the initial moisture content was 16%. The total bacteria decreased by 3.5-3.9 Log CFU/g during storage at three RHs, but mold and yeast increased rapidly at RH 90%.

**Keywords:** corn, *Cronobacter sakazakii*, pGFPuv, moisture content, RH, storage

### ABSTRAK

*Cronobacter sakazakii* adalah bakteri patogen bawaan pangan oportunistik yang dapat menyebabkan necrotizing enterocolitis, bacteremia, dan meningitis pada kelompok bayi tertentu. *C. sakazakii* telah dilaporkan dapat bertahan pada lingkungan dengan  $a_w$  rendah atau kondisi kering. Penggunaan inokulan *C. sakazakii* wild-type pada produk kering sulit dibedakan dengan *C. sakazakii* yang secara alami sudah ada pada produk tersebut. Mutan *C. sakazakii* pGFPuv telah dilaporkan memiliki pola pertumbuhan serupa dengan isolat wild-typenya, sehingga dapat digunakan untuk tujuan penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kadar air awal dan kelembaban relatif (RH) terhadap sintasan *C. sakazakii* pGFPuv dalam jagung pipilan selama penyimpanan pada suhu ruang. Penelitian ini terdiri dari pengeringan jagung pipilan untuk mencapai kadar air awal 12 dan 16% (bb), inokulasi *C. sakazakii* pGFPuv, dan penyimpanan pada RH 50, 70 dan 90% selama 12 minggu. Setiap dua minggu, jagung pipilan diukur kadar airnya dengan metode oven, aktivitas airnya dengan  $a_w$  meter, dan dihitung jumlah *C. sakazakii* pGFPuv dengan metode sebar, total bakteri dan jumlah kapang dan khamir dengan metode tuang. Jagung pipilan mencapai kadar air dan  $a_w$  kesetimbangan setelah 2 minggu penyimpanan. Jumlah *C. sakazakii* pGFPuv menurun dengan cepat selama penyimpanan pada RH 70 dan 90%, tetapi *C. sakazakii* pGFPuv dapat bertahan hidup pada RH 50% selama 12 minggu penyimpanan, terutama pada kadar air awal 16%. Total bakteri menurun sebesar 3,5-3,9 Log CFU/g pada ketiga RH penyimpanan, sedangkan jumlah kapang dan khamir meningkat pada RH 90%.

**Kata kunci:** *Cronobacter sakazakii* pGFPuv, jagung pipilan, kadar air, penyimpanan, RH

## PENDAHULUAN

*Cronobacter sakazakii* adalah bakteri patogen bawaan pangan oportunistik yang dapat menyebabkan gejala infeksi seperti radang usus (*necrotizing enterocolitis*), keracunan darah (*bacteremia*), dan radang selaput otak (*meningitis*) pada kelompok bayi tertentu dengan tingkat kematian 50-80% (Healy *et al.*, 2010). Menurut FAO-WHO (2008) sejak tahun 1958 sampai juli 2008 di dunia telah terjadi 120 kasus infeksi *C. sakazakii* pada bayi dan anak-anak sampai usia 3 tahun. Pada tahun 2010 dilaporkan adanya dugaan transmisi *C. sakazakii* dari susu formula ke bayi yang menyebabkan dua bayi sakit di Mexico (Jackson *et al.*, 2015). Sumber kontaminasi *C. sakazakii* dapat berasal dari lingkungan dan makanan (Iversen dan Forsythe, 2003). *C. sakazakii* telah diisolasi dari beberapa makanan seperti susu formula bayi, makanan bayi kering, produk keju dan ingredien makanan kering seperti bumbu dan rempah-rempah (Estuningsih *et al.*, 2006; Friedmann, 2007). Akan tetapi, hanya susu formula yang dihubungkan dengan infeksi *C. sakazakii* (Bowen dan Braden, 2006).

*C. sakazakii* dilaporkan lebih resisten terhadap kekeringan dibandingkan bakteri *E. coli*, *Salmonella*, dan *Enterobacteriaceae* lainnya dan dapat bertahan dalam kondisi kering lebih dari 2 tahun (Breeuwer *et al.*, 2003; Osaili dan Forsythe, 2009). *C. sakazakii* sudah dilaporkan bertahan dalam susu skim bubuk selama penyimpanan 3 bulan pada RH 50, 70 dan 90% (Dewanti-Hariyadi *et al.*, 2012). Bakteri patogen ini bertahan lebih baik pada aktivitas air ( $a_w$ ) rendah (0,25-0,30) daripada  $a_w$  tinggi (0,69-0,82) selama penyimpanan 12 bulan (Beuchat *et al.*, 2009). Penurunan jumlah *C. sakazakii* pada susu formula lebih besar pada  $a_w$  0,43-0,50 daripada  $a_w$  0,25-0,30 selama penyimpanan 12 bulan (Gurtler dan Beuchat, 2007).

Kemampuan *C. sakazakii* bertahan pada produk pangan kering selama penyimpanan berpotensi menjadikan produk pangan kering tersebut sebagai sumber bakteri patogen *C. sakazakii*. Untuk meneliti sintasan *C. sakazakii* pada produk pangan kering, penggunaan galur *wild-type* memiliki keterbatasan karena tidak dapat dibedakan dari *C. sakazakii* yang mungkin terdapat secara alami pada produk pangan tersebut. Untuk itu, penelitian ini memanfaatkan mutan *C. sakazakii* hasil transformasi dengan plasmid yang mengandung gen penyandi *green fluorescent protein* (pGFP) yang dapat berpendar hijau (Nurjanah *et al.*, 2014). Jagung dipilih karena secara luas digunakan sebagai bahan baku untuk produk pangan kering, baik dalam bentuk pati maupun tepung jagung. Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan *C. sakazakii* telah diisolasi dari jagung atau produk turunan jagung (Restaino *et*

*al.*, 2006; Gitapratwi *et al.*, 2012). Kadar air awal jagung dan kelembaban udara ruang penyimpanan (RH) diduga dapat mempengaruhi sintasan *C. sakazakii* selama proses penyimpanan. Untuk itu, pada penelitian ini penyimpanan jagung dilakukan dengan kadar air awal jagung (12 dan 16% bb) dan tingkat kelembaban udara ruang penyimpanan yang berbeda (RH 50, 70, dan 90%).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi sintasan *C. sakazakii* selama penyimpanan jagung pipilan dengan kadar air awal bahan dan RH (*relative humidity*) yang berbeda dengan menggunakan mutan *C. sakazakii* pGFPuv. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar pertimbangan dalam menyimpan jagung pipilan pada kondisi kadar air awal bahan dan RH ruang penyimpanan yang tepat sehingga keamanan pangan terjaga.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain jagung varietas Pioneer P27 Gajah (Kebun Percobaan IPB Cikabayan, Indonesia) dan isolat *Cronobacter sakazakii* pGFPuv E2 yang sudah ditransformasi dengan plasmid pGFPuv (SEAFast Center, Indonesia).

### Pembuatan jagung pipilan

Jagung varietas Pioneer P27 Gajah dengan umur panen 98 hari dipipil secara manual dan dikeringkan dengan *cabinet dryer* (H.ORTH GmbH, West Germany) pada suhu 50°C hingga diperoleh jagung pipilan dengan kadar air yang diinginkan yaitu 12 dan 16% bb.

### Konfirmasi isolat *Cronobacter sakazakii* pGFPuv

Konfirmasi isolat *C. sakazakii* pGFPuv mengacu pada penelitian Nurjanah *et al.* (2013). Stok beku isolat mutan *C. sakazakii* pGFPuv diinkubasi dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid Ltd, UK) yang disuplementasi 100 µg/mL ampisilin (PT. Erita Farma, Indonesia) pada suhu 37°C selama 24 jam. *C. sakazakii* pGFPuv dikonfirmasi dengan menumbuhkannya pada media TSA yaitu media *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Oxoid Ltd, UK) yang disuplementasi 100 µg/mL ampisilin dengan cara menggoreskan satu *loop* ke permukaan media tersebut. Setelah itu, kultur diinkubasi menggunakan inkubator (Heraeus, Germany) pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati di bawah sinar lampu UV (Desaga, Heidelberg, Germany) dengan panjang gelombang 366 nm. Koloni *C. sakazakii* pGFPuv akan tampak berfluoresen (berpendar hijau).

### Persiapan *Cronobacter sakazakii* pGFPuv sebagai Inokulum

Pembuatan inokulum *C. sakazakii* pGFPuv mengacu pada penelitian Nurjanah *et al.* (2013). Koloni berfluoresen yang tumbuh pada media TSAA disuspensikan dengan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW) (Oxoid Ltd, UK) dan disentrifugasi menggunakan sentrifus (HERMLE Z383K, Germany) dengan kecepatan 3500 rpm ( $2.600 \times g$ ) selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 10 mL BPW dan disentrifugasi kembali. Pelet sel diresuspensi dalam BPW, distandarisasi jumlah selnya dengan mengukur Optical Density (OD) pada  $\lambda=590$  nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-2450, Japan). Pengenceran dilakukan sampai mencapai nilai OD 0,4 yang setara dengan jumlah koloni  $10^8$  CFU/mL, dan selanjutnya suspensi mutan ini digunakan sebagai inokulum.

### Inokulasi dan penyimpanan jagung

Sejumlah *C. sakazakii* pGFPuv diinokulasikan ke jagung pipilan dalam kantong plastik steril kemudian diaduk rata sehingga jumlah awal *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan adalah  $10^6$  CFU/g. Kemudian, sampel disimpan di dalam botol kaca yang berisi larutan garam teknis  $K_2CO_3$  (RH  $\pm 50\%$ ),  $NaNO_3$  (RH  $\pm 70\%$ ) dan  $BaCl_2$  (RH  $\pm 90\%$ ) (Shen Zhen Yang Feng Industrial Co., Ltd., China) jenuh pada suhu ruang (27-30°C) selama 12 minggu (Greenspan, 1977). Percobaan diulang 2 kali untuk setiap perlakuan RH penyimpanan.

### Analisis kadar air dan aktivitas air ( $a_w$ ) selama penyimpanan jagung pipilan

Analisis kadar air dan  $a_w$  dilakukan pada kelompok kontrol setiap dua minggu selama 12 minggu penyimpanan. Kadar air jagung pipilan diukur menggunakan oven kadar air (Mettler, Western Germany) pada suhu 105°C selama minimal 6 jam (Nielsen, 2010). Pengukuran  $a_w$  dilakukan menggunakan alat  $a_w$  meter (Rotronic, USA) yang telah dikalibrasi (Passot *et al.*, 2012).

### Analisis jumlah *C. sakazakii* pGFPuv selama penyimpanan jagung pipilan

Sebanyak 10 g sampel dilarutkan ke dalam 90 mL BPW, dihomogenkan dengan pengocokan manual, dan dilakukan seri pengenceran untuk dipupukan dengan metode sebar ke dalam media TSAA ((TSA) + 100  $\mu$ g/mL ampisilin). Setelah itu, diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama  $\pm 24$  jam, kemudian koloni dihitung di bawah sinar lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm, sesuai *Standard Plate Count* (BAM, 2001). Kurva jumlah *C. sakazakii* selama penyimpanan dibuat dengan memplot jumlah koloni *C. sakazakii* (Log CFU/g) pada sumbu Y dan interval waktu (minggu) penyimpanan pada sumbu X.

### Kurva sintasan *C. sakazakii* selama penyimpanan jagung

Kurva ketahanan hidup isolat *C. sakazakii* pGFPuv dibuat dengan memplotkan logaritma jumlah koloni yang bertahan hidup pada waktu tertentu (Nt) dibagi dengan jumlah koloni awal (No) pada sumbu Y dan interval waktu (minggu) penyimpanan pada sumbu X. Laju penurunan jumlah (Log/minggu) selama penyimpanan ditunjukkan oleh besarnya slope dari persamaan linier (Nurjanah *et al.*, 2013).

### Analisis statistik

Perlakuan dilakukan sebanyak dua kali ulangan. Data jumlah *C. sakazakii* pGFPuv yang bertahan selama penyimpanan diuji normalitasnya dengan metode Saphiro Wilk. Pengaruh kadar air awal terhadap jumlah *C. sakazakii* pGFPuv selama penyimpanan dianalisis menggunakan uji t berpasangan jika data tersebar normal atau menggunakan uji *Mann-Whitney* jika data tidak tersebar secara normal. Pengaruh RH ruang penyimpanan terhadap jumlah *C. sakazakii* pGFPuv selama penyimpanan dianalisis menggunakan *One Way Anova* dengan uji lanjut Duncan jika data tersebar normal atau uji Friedman dengan uji lanjut Wilcoxon jika data tidak tersebar secara normal.

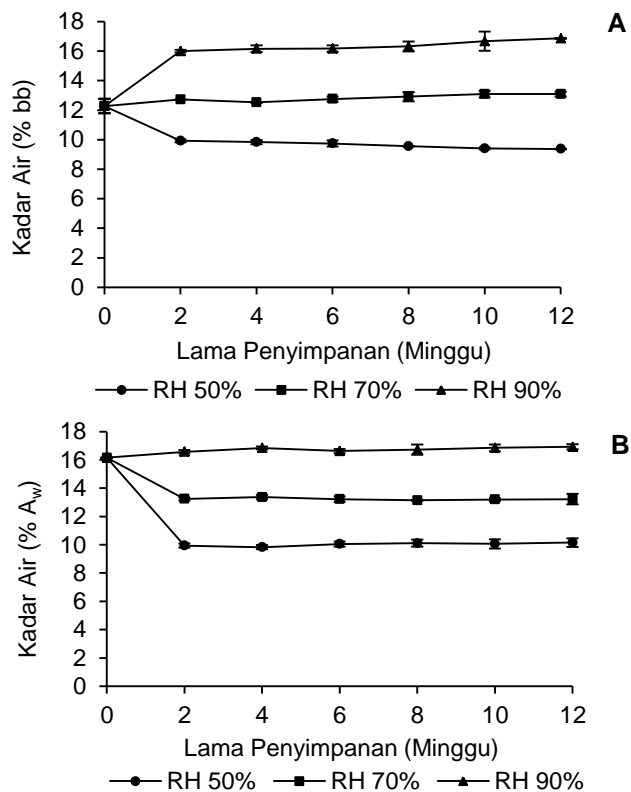
### Analisis total bakteri dan jumlah kapang dan khamir selama penyimpanan jagung pipilan

Analisis total bakteri dan jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan dilakukan setiap dua minggu selama 12 minggu penyimpanan. Sebanyak 10 g sampel dilarutkan ke dalam 90 mL BPW, dihomogenkan dengan pengocokan manual, dan dilakukan seri pengenceran. Total bakteri dianalisis menggunakan metode tuang dalam media *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid Ltd., UK) dan diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 35°C selama  $\pm 48$  jam (BAM, 2001). Jumlah kapang dan khamir dianalisis menggunakan metode tuang dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid Ltd, UK) ditambah asam tartarat 10% (Merck, USA) dan diinkubasi menggunakan inkubator (Fisher Scientific, USA) pada suhu 25°C selama 3-5 hari, mengacu pada penelitian Aguayo *et al.* (2006).

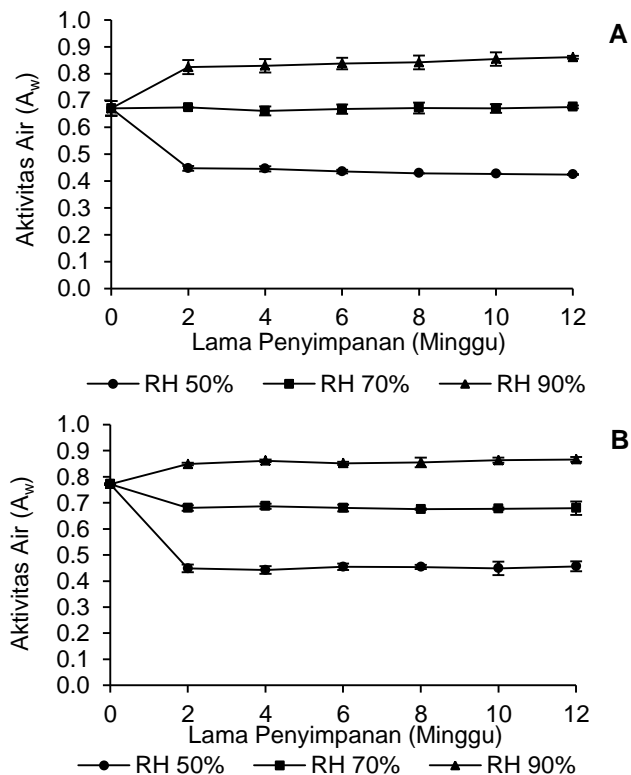
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Perubahan kadar air dan aktivitas air ( $a_w$ ) jagung pipilan selama penyimpanan

Kadar air dan  $a_w$  jagung pipilan mencapai kesetimbangan setelah penyimpanan 2 minggu pada RH penyimpanan 50, 70, dan 90% (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Perubahan kadar air jagung pipilan dengan kadar air awal 12% (A) dan 16% (B)



Gambar 2. Perubahan aktivitas air jagung pipilan dengan kadar air awal 12% (A) dan 16% (B)

Akan tetapi, jagung pipilan berkadar air awal 12% yang disimpan di RH 70% dan jagung pipilan berkadar air awal 16% yang disimpan di RH 90% sudah mengalami kadar air kesetimbangan dari awal penyimpanan. Demikian juga, jagung pipilan berkadar air 12% yang disimpan di RH 70% sudah mengalami  $a_w$  kesetimbangan dari awal penyimpanan. Kadar air kesetimbangan jagung pipilan yang disimpan pada RH 50, 70, dan 90% berturut-turut sebesar  $9,9\pm 0,09$ ;  $12,3\pm 0,5$ ;  $16\pm 0,08\%$  pada kadar air awal 12%, dan  $9,9\pm 0,15$ ;  $13,2\pm 0,11$ ;  $16,1\pm 0,01\%$  pada kadar air awal 16%. Sementara itu,  $a_w$  kesetimbangan jagung pipilan yang disimpan pada RH 50, 70, dan 90% berturut-turut sebesar  $0,45\pm 0,01$ ;  $0,67\pm 0,03$ ;  $0,82\pm 0,03$  pada kadar air awal 12% dan  $0,45\pm 0,01$ ;  $0,68\pm 0,01$ ;  $0,85\pm 0,00$  pada kadar air awal 16%. Kadar air dan  $a_w$  kesetimbangan jagung pipilan tersebut dipengaruhi oleh RH penyimpanan. Kingsly dan Ileleji (2009) menyatakan kelembaban udara (RH) yang tinggi memberikan nilai kadar air kesetimbangan jagung pipilan yang tinggi juga.

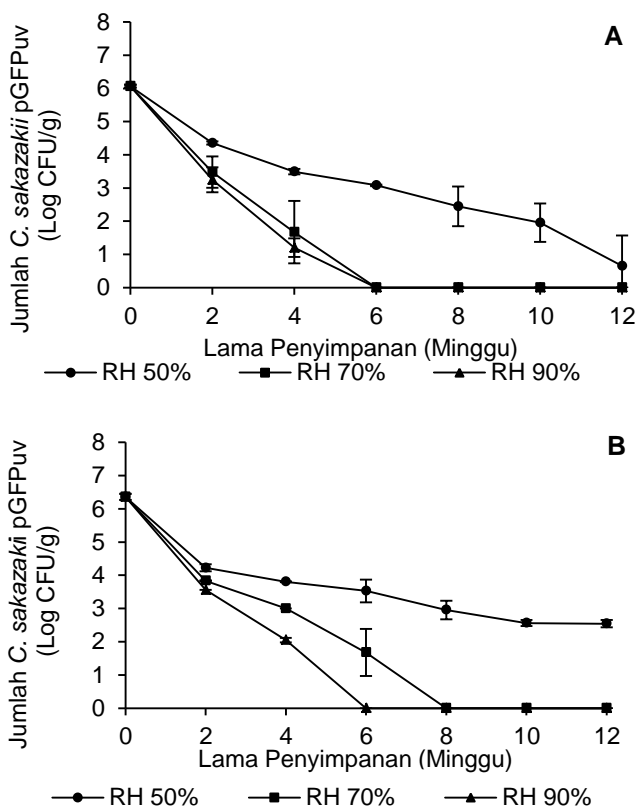
Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan kadar air awal yang berbeda jagung pipilan mencapai kadar air kesetimbangan yang serupa pada RH penyimpanan yang sama. Hal ini terjadi karena bila jagung pipilan berkadar air awal 12% disimpan di lingkungan dengan kelembaban relatif lebih tinggi maka jagung pipilan tersebut akan menyerap uap air dari lingkungannya hingga tercapai kondisi kadar air kesetimbangan. Sementara itu, apabila jagung pipilan berkadar air awal 16% disimpan di lingkungan dengan kelembaban relatif lebih rendah maka sebagian air dari produk pangan tersebut akan berpindah ke lingkungannya hingga kadar air kesetimbangan tercapai (Strelec *et al.*, 2010).

Hal serupa terjadi pada aktivitas airnya dimana dengan kadar air awal yang berbeda jagung pipilan mencapai  $a_w$  kesetimbangan yang serupa pada RH penyimpanan yang sama. Jagung pipilan berkadar air awal 12% memiliki  $a_w$  awal sebesar 0,67 dan ketika disimpan di lingkungan dengan kelembaban relatif tinggi akan menyerap uap air dari lingkungan hingga dicapai  $a_w$  kesetimbangannya. Sementara itu, jagung pipilan berkadar air awal 16% memiliki  $a_w$  awal sebesar 0,77 dan ketika disimpan di lingkungan dengan kelembaban relatif rendah akan melepas sebagian airnya ke lingkungan hingga dicapai  $a_w$  kesetimbangannya.

#### Perubahan jumlah *C. sakazakii* pada jagung pipilan selama penyimpanan

*C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% mengalami penurunan selama penyimpanan pada tiga RH yang berbeda. Penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv pada RH 50% lebih lambat daripada RH 70 dan 90% (Gambar 3). Pada 12 minggu penyimpanan, *C. sakazakii* pGFPuv yang bertahan pada jagung

pipilan berkadar air awal 12 dan 16% di RH 50% berturut-turut sebesar  $0,7 \pm 0,92$  dan  $2,5 \pm 0,11$  Log CFU/g sedangkan pada RH 70 dan 90% sudah tidak ada bakteri *C. sakazakii* pGFPuv yang bertahan. Penurunan *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% yang disimpan pada RH 50% selama 12 minggu berturut-turut sebesar 5,4 dan 3,8 Log CFU/g. Jumlah *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan setelah penyimpanan tersebut dipengaruhi oleh RH penyimpanan ( $P < 0,05$ ). Laporan serupa oleh Dewanti-Hariyadi *et al.* (2012) juga menunjukkan penurunan *C. sakazaki* pada susu skim selama 12 minggu penyimpanan dipengaruhi oleh RH penyimpanan, dimana penurunan terbesar terjadi pada RH 90% dibandingkan RH 50 dan 70%.

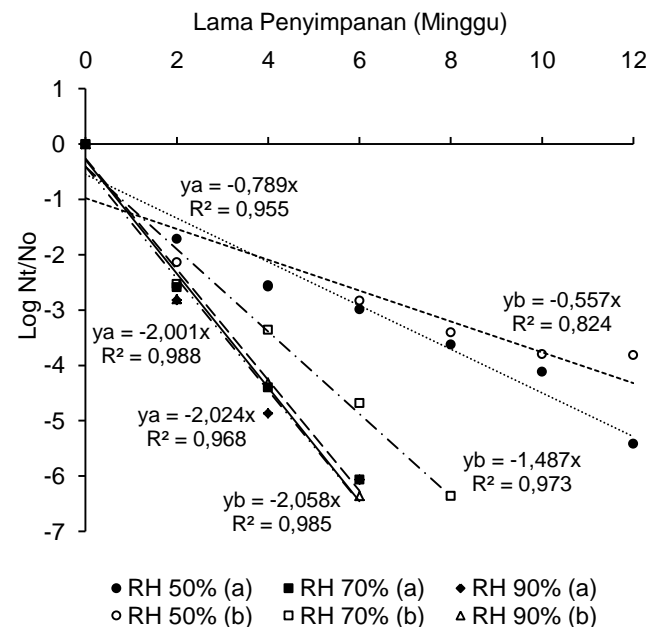


Gambar 3. Perubahan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan dengan kadar air awal 12% (A) dan 16% (B)

Penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv yang lambat pada RH 50% juga berkaitan dengan penurunan  $a_w$ -nya selama penyimpanan. Menurut Gurtler dan Beuchat (2007) kelangsungan hidup *C. sakazakii* meningkat ketika  $a_w$  sangat rendah. Aktivitas air jagung pipilan yang disimpan pada RH 50% lebih rendah daripada RH 70% dan RH 90%.  $a_w$  jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% di RH 50% berturut-turut sebesar  $0,45 \pm 0,01$  dan  $0,45 \pm 0,01$  sedangkan di RH 70% sebesar  $0,67 \pm 0,03$  dan  $0,68 \pm 0,01$ , dan di RH 90% sebesar  $0,82 \pm 0,03$  dan

$0,85 \pm 0,00$ . Penelitian Beuchat *et al.* (2009) menunjukkan *C. sakazakii* bertahan lebih baik pada formula dan sereal bayi dengan  $a_w$  0,25-0,30 daripada  $a_w$  0,69-0,82 selama penyimpanan 12 bulan. Lin dan Beuchat (2007) menyatakan dengan meningkatnya  $a_w$  dapat mempercepat laju kematian *C. sakazakii*. Selain itu, meningkatnya jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan yang disimpan di RH 90% juga dapat menyebabkan penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv yang sangat cepat dibandingkan pada jagung pipilan yang disimpan di RH 50%.

Sintasan *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan dapat diketahui dengan membandingkan laju penurunan jumlah koloni yang bertahan hidup pada waktu tertentu (Nt) dengan jumlah koloni awal (No). Laju penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv per minggu ditunjukkan oleh besarnya slope yang diperoleh dari persamaan linier kurva sintasan. Laju penurunan jumlah isolat *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% yang disimpan di RH 50% lebih lama dibandingkan pada RH 70 dan 90% (Gambar 4). Hal ini ditunjukkan dengan nilai slope dari persamaan linier RH 50% lebih kecil dibandingkan RH 70 dan 90%. Pada jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16%, laju penurunan *C. sakazakii* pGFPuv pada RH 50% berturut-turut sebesar 0,789 dan 0,557 siklus Log/minggu, sedangkan pada RH 70% berturut-turut sebesar 2,001 dan 1,487 siklus Log/minggu, dan pada RH 90% berturut-turut sebesar 2,024 dan 2,058 siklus Log/minggu.



Gambar 4. Sintasan *C. sakazakii* pGFPuv mutan pada jagung pipilan berkadar air awal 12% (a) dan 16% (b) selama penyimpanan pada RH 50, 70, dan 90%

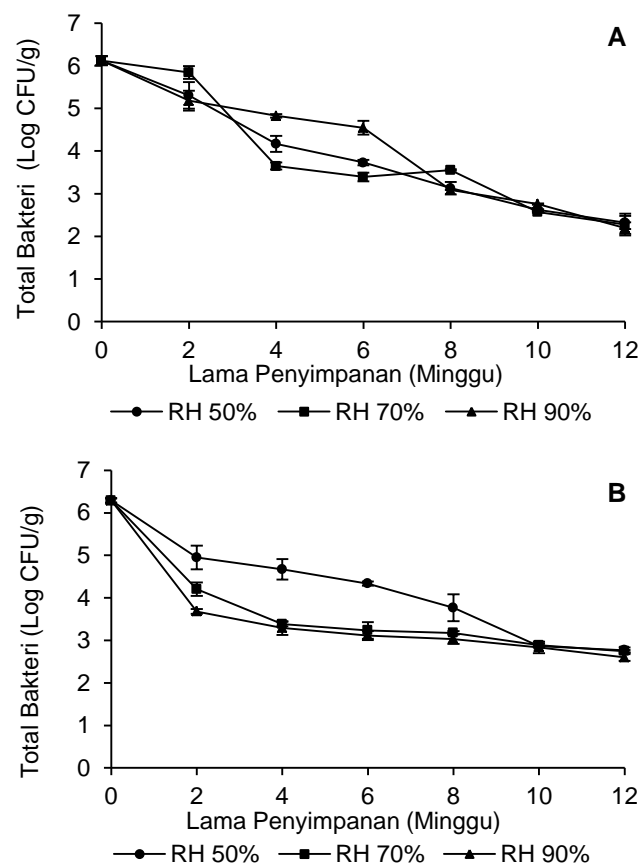
Pada RH 50%, laju penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv di jagung pipilan berkadar air awal 16% lebih lambat dibandingkan dengan jagung pipilan berkadar air awal 12%. Hal ini ditunjukkan dengan nilai slope dari persamaan garis linier jagung pipilan berkadar air awal 16% yang lebih kecil dibandingkan dengan jagung pipilan berkadar air awal 12%. Pada RH 50%, laju penurunan jumlah *C. sakazakii* pGFPuv di jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% berturut-turut sebesar 0,789 dan 0,557 siklus Log/minggu. Akan tetapi, berdasarkan uji non parametrik independent samples, kadar air awal jagung pipilan berpengaruh tidak nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap jumlah *C. sakazakii* pGFPuv yang bertahan hidup di RH 50% setelah penyimpanan. Hal ini disebabkan karena kedua taraf kadar air awal jagung pipilan tersebut pada RH 50% mengalami kadar air kesetimbangan setelah minggu kedua dan memiliki kadar air yang serupa selama penyimpanan. Kadar air jagung pipilan berkadar air awal 12 dan 16% berturut-turut memiliki kadar air selama penyimpanan 9,4-9,9% dan 9,8-10,1%.

Penelitian Breeuwer *et al.* (2003) menunjukkan sintasan *C. sakazakii* pada kondisi kering disebabkan oleh kemampuannya mengakumulasi trehalosa, yang berperan dalam menstabilkan membran fosfolipid dan proteinnya. Trehalosa akan berikatan (ikatan hidrogen) secara langsung dengan gugus polar dari fosfolipid sehingga dapat menstabilkan ikatan yang sebelumnya ditempati air (Patist dan Zoerb, 2005). Trehalosa dapat meningkatkan tegangan permukaan dengan cairan intraseluler sehingga dapat mencegah terjadinya autolisis. Semakin banyak cairan intraseluler terikat dengan trehalosa maka interaksi hidrofobik intramolekuler akan semakin meningkat, sehingga kerusakan membran dan protein dapat dicegah (Leslie *et al.*, 1995). Selain trehalosa, adanya zat terlarut betaine juga dapat membuat *C. sakazakii* resisten terhadap kondisi kering (Feeney *et al.*, 2014). Menurut penelitian Riedel dan Lehner (2007) *C. sakazakii* dapat bertahan dalam keadaan kering karena adanya akumulasi protein yang berperan struktural dan protektif. Protein tersebut adalah protein *heat shock* (Hsp), protein *cold shock* (Cspc), protein perlindungan dan perbaikan (Dps), protein pengikatan DNA (Hns) seperti histon, dan protein protektif yang melawan oksigen radikal, superoksida dismutase, dan alkil hidroperoksida reduktase.

### Perubahan total bakteri pada jagung pipilan selama penyimpanan

Total bakteri pada jagung pipilan mengalami penurunan selama 12 minggu penyimpanan pada ketiga RH (Gambar 5). Pada jagung pipilan dengan kadar air awal 12%, total bakteri setelah penyimpanan pada RH 50, 70, 90% berturut-turut sebesar  $2,3 \pm 0,15$ ;  $2,3 \pm 0,25$  dan  $2,2 \pm 0,14$  Log CFU/g dari

jumlah awal  $6,1 \pm 0,1$  Log CFU/g. Sementara itu, pada jagung pipilan dengan kadar air awal 16%, total bakteri setelah penyimpanan pada RH 50, 70, 90% berturut-turut sebesar  $2,8 \pm 0,06$ ;  $2,7 \pm 0,02$ ; dan  $2,6 \pm 0,08$  Log CFU/g dari jumlah awal  $6,3 \pm 0,05$  Log CFU/g. Total bakteri pada jagung pipilan setelah penyimpanan tersebut tidak berbeda signifikan meskipun kadar air awal dan RH yang berbeda.



Gambar 5. Perubahan total bakteri pada jagung pipilan dengan kadar air awal 12% (A) dan 16% (B)

Total bakteri di jagung pipilan berkadar air awal 12% turun lebih banyak daripada jagung pipilan berkadar air awal 16% selama 12 minggu penyimpanan. Penurunan total bakteri di jagung pipilan berkadar air awal 12% sebesar 3,8; 3,8; 3,9 Log CFU/g berturut-turut pada RH 50, 70, dan 90%, sedangkan pada jagung pipilan berkadar air awal 16% sebesar 3,5; 3,6; 3,7 Log CFU/g berturut-turut pada RH 50, 70, dan 90%. Penurunan total bakteri pada RH 50 dan 70% dapat disebabkan oleh penurunan nilai  $a_w$  jagung pipilan selama penyimpanan dimana  $a_w$  tersebut tidak sesuai untuk pertumbuhan bakteri. Nilai  $a_w$  jagung pipilan berkadar air 12 dan 16% selama penyimpanan sebesar 0,43-0,46 pada RH 50% dan 0,66-0,69 pada RH 70%. Penelitian Leong *et al.* (2012) menemukan bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc*

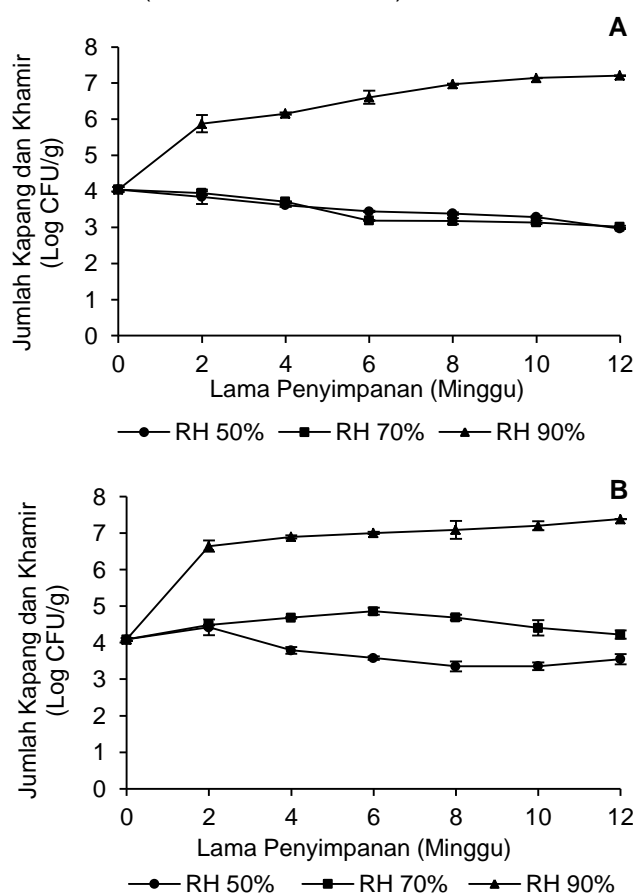
*citreum*) muncul di awal penyimpanan dan bakteri *Enterobacteriaceae* dominan selama penyimpanan jagung. Akan tetapi, pertumbuhan bakteri asam laktat dan *Enterobacteriaceae* dipengaruhi oleh nilai  $a_w$ -nya, dimana bakteri asam laktat dan *Enterobacteriaceae* tidak dapat tumbuh berturut-turut pada  $a_w$  di bawah 0,90 dan 0,95. Ketika bakteri terpapar pada lingkungan ber- $a_w$  rendah, jumlah air bebas pada jagung pipilan tersebut tidak cukup untuk mempertahankan viabilitas selnya sehingga sel mengalami dehidrasi dan tidak mampu untuk tumbuh atau bahkan mengalami kematian (Sperber dan Doyle, 2009). Sementara itu, penurunan total bakteri pada RH 90% dapat disebabkan oleh meningkatnya jumlah kapang dan khamir akibat meningkatnya  $a_w$  jagung pipilan pada RH 90%. Peningkatan jumlah kapang dan khamir tersebut menyebabkan interaksi antagonis dengan bakteri dalam bersaing mendapatkan nutrisi dari substrat jagung pipilan (Mille-Lindblom *et al.*, 2006).

#### Perubahan jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan selama penyimpanan

Jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan berkadar air 12% setelah penyimpanan 12 minggu pada RH 50, 70, dan 90% berturut-turut adalah  $3 \pm 0,01$ ;  $3 \pm 0,03$  dan  $7,2 \pm 0,01$  Log CFU/g dari jumlah awal  $4,1 \pm 0,07$  Log CFU/g. Sementara itu, jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan berkadar air awal 16% setelah penyimpanan 12 minggu di RH 50, 70, dan 90% berturut-turut sebesar  $3,5 \pm 0,14$ ;  $4,2 \pm 0,11$  dan  $7,4 \pm 0,01$  Log CFU/g dari jumlah awal  $4,1 \pm 0,04$  Log CFU/g. Selama penyimpanan 12 minggu, jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan berkadar air awal 12% yang disimpan pada RH 50 dan RH 70% mengalami penurunan sebesar 1,1 Log CFU/g, sedangkan pada RH 90% mengalami peningkatan sebesar 3,1 Log CFU/g, dan jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan berkadar air awal 16% yang disimpan pada RH 50% mengalami penurunan sebesar 0,6 Log CFU/g, sedangkan pada RH 70 dan RH 90% mengalami peningkatan berturut-turut sebesar 0,1 dan 3,3 Log CFU/g (Gambar 6). Jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan setelah penyimpanan tersebut dipengaruhi oleh RH penyimpanan. Menurut Kusumaningrum *et al.* (2010), kelembaban relatif merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kapang *A. flavus* pada jagung pipilan di daerah Bojonegoro selama penyimpanan.

Jumlah kapang dan khamir setelah penyimpanan pada jagung pipilan baik berkadar air awal 12 maupun 16% yang disimpan di RH 90% lebih besar daripada RH 50 dan 70%. Selain disebabkan oleh RH penyimpanan yang lebih tinggi, pertumbuhan kapang dan khamir pada RH 90% tersebut berkaitan dengan peningkatan  $a_w$ -nya, yaitu 0,83-0,87, yang merupakan  $a_w$  yang sesuai untuk pertumbuhan

kapang dan khamir.  $a_w$  minimal untuk pertumbuhan kapang dan khamir pembusuk berturut-turut adalah 0,84 dan 0,90 (Sperber dan Doyle, 2009). Menurut Marin *et al.* (1998), kapang *Aspergillus* spp. pada media ekstrak jagung dapat bergerminasi pada  $a_w$  0,85-0,88, dimana *Aspergillus niger* mampu bergerminasi pada  $a_w$  0,8, sedangkan *Aspergillus flavus* pada 0,85. *A. awamori* yang diisolasi dari jagung pipilan memiliki  $a_w$  minimal pertumbuhan 0,85 pada suhu 30°C (Astoreca *et al.*, 2007).



Gambar 6. Perubahan jumlah kapang dan khamir pada jagung pipilan dengan kadar air awal 12% (A) dan 16% (B)

Selain karena  $a_w$  jagung pipilan, pertumbuhan kapang dan khamir pada RH 90% juga disebabkan oleh peningkatan kadar airnya. Kadar air jagung pipil berkadar air awal 12 dan 16% yang disimpan di RH 90% setelah penyimpanan sebesar 16-16,9 sedangkan di RH 70% sebesar 12,3-13,4, dan di RH 50% sebesar 9,4-10,1. Menurut penelitian Reed *et al.* (2007) jagung yang berkadar air lebih tinggi mengalami pertumbuhan kapang yang lebih banyak daripada jagung yang berkadar air lebih rendah. Jumlah kapang pada jagung yang berkadar air 18% lebih tinggi dibandingkan dengan jagung berkadar air 14,8% setelah penyimpanan selama 2 minggu pada suhu 25°C.

## KESIMPULAN

Sintasan *C. sakazakii* pGFPuv pada jagung pipilan lebih dipengaruhi oleh RH ruang penyimpanan dibandingkan dengan kadar air awal jagung pipilan. *C. sakazakii* pGFPuv lebih bertahan hidup pada RH 50% dibandingkan RH 70 dan 90% selama 12 minggu penyimpanan. Ketahanan hidup *C. sakazakii* pGFPuv ini berkaitan dengan kemampuannya untuk bertahan hidup pada kondisi  $a_w$  yang lebih rendah selama penyimpanan di RH 50% yaitu  $a_w$  0,43-0,46. *C. sakazakii* pGFPuv dapat bertahan hidup pada RH 50%, terutama pada jagung pipilan berkadar air awal 16%. Dengan demikian, sebaiknya penyimpanan jagung pipilan dilakukan dengan kadar air awal 12% (bb) pada RH 50%, karena selain menurunkan jumlah kapang dan khamirnya sebesar 1,1 Log CFU/g dan total bakteri sebesar 3,8 Log CFU/g, juga dapat menurunkan jumlah *C. sakazakii* sebesar 5,4 Log CFU/g.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aguayo E, Escalona VH, Artes F. 2006. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physico-chemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol Tech* 39: 169-177. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2005.11.005.
- Astoreca A, Magnoli C, Ramirez ML, Combina M, Dalcerro A. 2007. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *Int J Food Microbiol* 119: 314-318. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.027.
- [BAM] Bacteriological Analytical Manual. 2001. Chapter 3: Aerobic plate count. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm> [04 November 2014].
- Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards GM. 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int J Food Microbiol* 136: 204-213. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.
- Bowen AB, Braden CR. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis* 12: 1185-1189. DOI: 10.3201/eid1208.051509.
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 95: 967-973. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x.
- Dewanti-Hariyadi R, Larasati F, Nuraida L. 2012. Survival of *Cronobacter sakazakii* in skim milk during spray drying, storage, and reconstitution. *J Teknol Industri Pangan* 23: 186-192. DOI: 10.6066/jtip.2012.23.2.186.
- Estuningsih S, Kress C, Hassan AA, Akineden Ö, Schneider E, Usleber E. 2006. *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *J Food Protect* 69: 3013-3017.
- [FAO-WHO] Food and Agriculture Organization-World Health Organization. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, No. 15, Roma, Itali. hlm 1-86. [http://www.who.int/food\\_safety/publications/micro/MRA\\_followup.pdf](http://www.who.int/food_safety/publications/micro/MRA_followup.pdf). [04 November 2014].
- Feeney A, Johnston CD, Govender R, O'Mahony J, Coffe A, Sleator RD. 2014. Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance. *Gut Pathogens* 6: 15. DOI: 10.1186/1757-4749-6-15.
- Friedmann M. 2007. Review. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol* 116: 1-10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018.
- Gitapratwi D, Dewanti-Hariyadi R, Hidayat SH. 2012. Genetic relatedness of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from dried food products in Indonesia. *Int Food Res J* 19: 1745-1749.
- Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J Res Nat Bureau Stand-a Physics Chem* 81A: 89-96.
- Gurtler JB, Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J Food Protect* 70: 1579-1586.
- Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning S. 2010. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen – a review. *Foodborne Pathog Dis* 7: 339-350. DOI: 10.1089/fpd.2009.0379.
- Iversen C, Forsythe S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol* 14: 443-454. DOI: 10.1016/S0924-2244(03)00155-9.
- Jackson EE, Flores JP, Fernandez-Escartin E, Forsythe SJ. 2015. Reevaluation of a Suspected *Cronobacter sakazakii* Outbreak in Mexico. *J Food Protect* 78: 1191-1196. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-563.



- Kingsly ARP, Ileleji KE. 2009. Sorption isotherm of corn distillers dried grains with solubles (DDGS) and its prediction using chemical composition. *Food Chem* 116: 939-946. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.050.
- Kusumaningrum HD, Suliantari, Toha AD, Putra SH, Utami AS. 2010. Cemaran *Aspergillus flavus* dan aflatoxin pada rantai distribusi produk pangan berbasis jagung dan faktor yang mempengaruhinya. *J Teknol Industri Pangan* 21: 171-176.
- Leong S-LL, Niba AT, Ny S, Olstorpe M. 2012. Microbial populations during maize storage in Cameroon. *Afr J Biotechnol* 11: 8692-8697. DOI: 10.5897/AJB12.108.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61: 3592-3597.
- Lin LC, Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereals as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiol* 24: 767-777. DOI: 10.1016/j.fm.2007.02.001.
- Marin S, Sanchis V, Saenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. 1998. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *J Appl Microbiol* 84: 25-36. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00297.x.
- Mille-Lindblom C, Fischer H, Tranvik LJ. 2006. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos* 113: 233-242. DOI: 10.1111/j.2006.0030-1299.14337.x.
- Nielsen SS. 2010. *Food Analysis Laboratory Manual*. Second Edition. 17-20. Springer, West Lafayette IN, USA.
- Nurjanah S, Dewanti-Hariyadi R, Estuningsih S, Suhartono MT. 2014. Stability and Growth Characteristic GFPuv-Labeled *Cronobacter sakazakii* Isolated from Foods. *Food Sci Biotechnol* 23: 1491-1496. DOI: 10.1007/s10068-014-0204-3.
- Nurjanah S, Suhartono MT, Dewanti-Hariyadi R, Estuningsih S. 2013. Aplikasi mutan berfluoresens untuk mempelajari ketahanan hidup kolonisasi dan penetrasi isolat *Cronobacter sakazakii* selama pengeringan jagung. *J Teknol Industri Pangan* 24: 184-193. DOI: 10.6066/jtip.2013.24.2.184.
- Osaili T, Forsythe S. 2009. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol International* 136: 214-220. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006.
- Passot S, Cenard S, Douanial, Tréléal C, Fonseca F. 2012. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem* 132: 1699-1705. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.06.012.
- Patist A, Zoerb H. 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Coll Surface B: Biointerface* 40: 107-113. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.003.
- Reed C, Doyungan S, Ioerger B, Getchell A. 2007. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25°C, and effect on respiration rate and nutrient composition. *J Stored Prod Res* 43: 443-458. DOI: 10.1016/j.jspr.2006.12.006.
- Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. 2006. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. *J Food Protect* 69: 315-322.
- Riedel K, Lehner A. 2007. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics* 7: 1217-1231. DOI: 10.1002/pmic.200600536.
- Sperber WH, Doyle MP. 2009. *Food Microbiology and Food Safety. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. 8-9,267. Springer Science Inc, New York.
- Strelec I, Popovic R, Ivanisic I, Jurkovic V, Jurkovic Z, Ugarcic-Hardi Z, Sabo M. 2010. Influence of temperature and relative humidity on grain moisture, germination and vigour of three wheat cultivars during one year storage. *Poljoprivreds* 16: 20-24.