

Homogenitas, Stabilitas, dan Konfirmasi Molekuler Biakan Kering Beku Campuran *Escherichia coli* dan *Salmonella Typhimurium*

[Homogeneity, Stability, and Molecular Confirmation of Mixed Culture of Freeze-Dried *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*]

Siti Nurjanah^{1,2)*}, Puja Agesti¹⁾, Winiati Pudji Rahayu^{1,2)}, Uswatun Hasanah^{1,2)} dan Riska Dwi Nanda¹⁾

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ South-East Asia Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, IPB University, Bogor, Indonesia

Received September 21st 2023 / Revised August 20th 2024 / Accepted September 9th 2024

ABSTRACT

Food product testing laboratories play a prominent role in ensuring safety and quality of products manufactured by food industries; therefore, they shall comply with standards of ISO/IEC 17025:2017. Although a proficiency test for microbiological parameter is required to evaluate testing laboratories' performance in considering food product quality and safety, the existence of proficiency test organizations in Indonesia is currently still limited. This study was conducted to determine the appropriate types of cryoprotectant, evaluate the degree of homogeneity and stability of the freeze-dried cultures of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* for preparation of proficiency testing item, as well as molecular confirmation of *E. coli* and *S. Typhimurium* bacteria using PCR. The freeze-dried cultures were prepared for the purpose of producing the proficiency testing object. Three main stages were conducted, namely cryoprotectant effectiveness test, homogenization test and stability test at 4 °C storage temperature for four different times (0, 7, 14, 65 days), as well as molecular confirmation test. The best cryoprotectant treatment was using 10% trehalose with the viable *E. coli* and *S. Typhimurium* respectively 5.58 ± 0.25 and 5.31 ± 0.09 log CFU/mL. Freeze-dried culture samples of *E. coli* and *S. Typhimurium* was declared homogeneous and stable based on ISO 13528:2015 calculations. *E. coli* bacteria were confirmed using standard PCR with 16S rRNA primer, while *S. Typhimurium* was confirmed using rt-PCR with *invA* primer.

Keywords: cryoprotectant, *E. coli*, proficiency test, real-time PCR, *S. Typhimurium*

ABSTRAK

Laboratorium pengujian produk pangan memegang peranan penting dalam menjamin kualitas produk yang dihasilkan oleh industri pangan dan harus memenuhi persyaratan ISO/IEC 17025:2017. Uji profisiensi parameter mikrobiologi sangat dibutuhkan dalam pengajuan registrasi produk dan izin edar. Keberadaan lembaga penyelenggara uji profisiensi di Indonesia saat ini masih terbatas. Penelitian ini bertujuan menentukan jenis krioprotektan yang tepat, mengevaluasi tingkat homogenitas dan stabilitas biakan kering beku *Escherichia coli* dan *Salmonella Typhimurium* untuk penyiapan objek uji profisiensi, serta mengonfirmasi molekuler bakteri *E. coli* dan *S. Typhimurium* menggunakan PCR. Kultur beku kering disiapkan untuk tujuan menghasilkan objek uji profisiensi. Tiga tahapan utama yang dilakukan yaitu uji efektivitas krioprotektan, uji homogenitas dan uji stabilitas pada suhu penyimpanan 4 °C selama empat waktu yang berbeda (0, 7, 14, 65 hari), serta uji konfirmasi molekuler. Perlakuan krioprotektan yang terbaik adalah menggunakan 10% trehalosa dengan viabilitas *E. coli* dan *S. Typhimurium* masing-masing $5,58 \pm 0,25$ dan $5,31 \pm 0,09$ log CFU/mL. Sampel biakan kering beku *E. coli* dan *S. Typhimurium* dinyatakan homogen dan stabil berdasarkan perhitungan ISO 13528:2015. Bakteri *E. coli* terkonfirmasi menggunakan PCR standar dengan primer 16S rRNA, sedangkan bakteri *S. Typhimurium* terkonfirmasi menggunakan rt-PCR dengan primer *invA*.

Kata kunci: *E. coli*, krioprotektan, *S. Typhimurium*, real-time PCR, uji profisiensi

*Penulis Korespondensi: E-mail: sity_nr@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Laboratorium pengujian produk pangan memegang peranan penting dalam menjamin kualitas produk yang dihasilkan oleh industri pangan. Laboratorium pengujian agar mendapatkan akreditasi saat melakukan pengujian produk perlu memenuhi persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi berdasarkan SNI ISO/IEC 17025:2017 yang diakreditasi oleh lembaga akreditasi Komite Akreditasi Nasional (KAN).

Uji profisiensi adalah suatu kegiatan yang dilakukan untuk mengevaluasi kinerja laboratorium pada periode tertentu sesuai dengan acuan ISO/IEC 17043: 2010 dan ISO 13528:2015 (Oktarina, 2021). Uji profisiensi parameter mikrobiologi sangat dibutuhkan untuk memastikan kinerja laboratorium pengujian yang berkontribusi dalam memastikan kualitas dan keamanan produk. Keberadaan lembaga penyelenggara uji profisiensi di Indonesia saat ini sangat terbatas, hanya tersedia enam PUP dengan lingkup komoditas pangan. Adapun jumlah laboratorium pengujian kualitas pangan di Indonesia saat ini mencapai 461 laboratorium, sehingga keberadaan PUP diperlukan lebih banyak (KAN, 2022).

Keberadaan kelompok *Enterobacteriaceae* seringkali menjadi salah satu parameter keamanan produk pangan. *Enterobacteriaceae* merupakan keluarga besar dan beragam dari bakteri Gram-negatif. Kelompok dari bakteri ini bervariasi dan dapat hidup dan berkembang di usus manusia hingga muncul sebagai organisme oportunistik yang dapat menyebabkan penyakit dalam kondisi tertentu (Alajmi *et al.*, 2023). *Escherichia coli* dan *Salmonella* Typhimurium termasuk bakteri Gram negatif lebih sensitif terhadap dehidrasi dan mempunyai lapisan peptidoglikan yang lebih tipis daripada bakteri Gram positif (Hamidah *et al.*, 2019).

Liofilisasi atau pengeringan beku adalah teknik yang terkenal dalam industri pangan dan farmasi yang memungkinkan stabilisasi, penyimpanan, dan pengangkutan bahan yang tidak stabil melalui dehidrasi (Farr *et al.*, 2021). Liofilisasi menghasilkan karakteristik produk akhir yang unggul diantaranya stabilitas komposisi, nutrisi yang masih utuh, reduksi degradasi pada produk yang sensitif terhadap panas, reduksi degradasi kimia, reduksi kadar air pada akhir proses ke level yang sangat rendah, dan kontrol kelembaban akhir (Nireesha *et al.*, 2013). Liofilisasi dapat menimbulkan efek stres terhadap sel bakteri. Sel dapat mengalami *cold stress* ketika tahap pembekuan, sehingga dapat mengakibatkan kerusakan sel dan melemahkan perlindungan dinding sel, dengan adanya krioprotektan dapat meningkatkan resistensi stres akibat liofilisasi (Cui *et al.*, 2022).

Krioprotektan memiliki dampak penting pada efek kriopreservasi. Selama kriopreservasi, krioprotektan yang sesuai dapat mengurangi kerusakan

akibat *freeze-thaw* dan berdampak pada perubahan tekanan osmotik terhadap kelangsungan hidup bakteri (Prakash *et al.*, 2013). Krioprotektan yang ideal harus memiliki kelarutan air yang tinggi, permeabilitas, toksisitas rendah, non-reaktif, dan tidak ada pengendapan pada konsentrasi tinggi. Krioprotektan dapat mempertahankan integritas fungsional DNA struktural bakteri. Krioprotektan yang paling umum digunakan dalam liofilisasi adalah disakarida seperti glukosa, laktosa, sukrosa, dan trehalosa (Kusuma *et al.*, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis krioprotektan yang tepat dalam pembuatan biakan kering beku campuran mikroba *E. coli* dan *S. Typhimurium* untuk objek uji profisiensi, mengevaluasi tingkat homogenitas dan stabilitas biakan kering beku *E. coli* dan *S. Typhimurium* serta mengonfirmasi bakteri *E. coli* menggunakan PCR standar dan bakteri *S. Typhimurium* menggunakan *rt*-PCR.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan meliputi biakan kering beku *Escherichia coli* (ATCC 25922) dan *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) (Oxoid, Inggris), trehalosa (HiMedia, India), susu skim (Difco™, Amerika Serikat), sukrosa (Merck, Indonesia), *McFarland Standards 4.0* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), BPW (*Buffered Peptone Water*) (Oxoid, Inggris), TBX (*Tryptone Bile X-Glucuronide Medium*) (Oxoid, Inggris), XLDA (*Xylose Lysine Deoxycholate Agar*) (Oxoid, Inggris), DNA *template*, gen primer *InvA* 119 bp (Geneaid, Taiwan), gen primer 16S rRNA 585 bp (Geneaid, Taiwan), reagen *Chelex-100* (Sigma katalog No. C7901, Amerika), 1000 µL *buffer TE* (10 mM TRIS-Base, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0), 100 µL *buffer lisis TES* (1 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM TRIS-Base, pH 7,5; 0,5% SDS), 2 µL RNase A (Thermo, katalog No. EN0531), 7,5 µL proteinase K 20 mg/mL (Amresco, katalog No. 0706-100MG, Amerika), natrium asetat 3 M pH 5,2, etanol 95% (Smart-lab, Indonesia), *nuclease free water* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), Master mix (Thermo Fisher Scientific, Amerika), SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Amerika).

Uji efektivitas krioprotektan

Setiap perlakuan krioprotektan dipersiapkan dengan membuat larutan stok 20% trehalosa, 20% susu skim, dan 20% sukrosa. Rancangan kombinasi perlakuan krioprotektan yang digunakan adalah 0 (tanpa perlakuan atau disebut perlakuan 1), 10% trehalosa (perlakuan 2), 10% trehalosa+10% susu skim (perlakuan 3), dan 10% trehalosa+10% sukrosa (perlakuan 4).

Sebanyak 0,5 mL pelet *E. coli* (sekitar 10^9 CFU/mL) dicampur dengan 0,5 mL pelet *S. Typhimurium* (sekitar 10^9 CFU/mL). Bakteri campuran yang telah dipersiapkan diinokulasikan ke dalam krioprotektan dengan perbandingan 1:1 yaitu 1 mL bakteri campuran *E. coli* dan *S. Typhimurium*: 1 mL krioprotektan. Kemudian, dipersiapkan masing-masing vial secara duplo untuk setiap perlakuan. Pengujian viabilitas dilakukan dengan melakukan pengenceran serial hingga 10^{-5} , lalu diinokulasikan pada dua media yaitu TBX untuk menumbuhkan bakteri *E. coli* dan media XLDA untuk menumbuhkan bakteri *S. Typhimurium*. Kemudian, cawan yang telah dituangkan bakteri *E. coli* pada media TBX dilakukan inkubasi pada suhu 44 ± 2 °C selama 24 ± 2 jam dengan posisi terbalik dan cawan yang telah dituangkan bakteri *S. Typhimurium* pada media XLDA dilakukan inkubasi pada suhu 35 ± 2 °C selama 24 ± 2 jam dengan posisi terbalik. Perlakuan krioprotektan terbaik yang memiliki viabilitas tertinggi diperbanyak dan dilanjutkan ke tahap berikutnya. Perhitungan viabilitas bakteri *E. coli* dan *S. Typhimurium* dapat dihitung menggunakan rumus *plate count* sebagai berikut (BAM, 2001).

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_1) \times d]} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan: $\sum C$ = jumlah total koloni dari semua cawan yang dihitung, N = jumlah koloni per g/mL (CFU/g atau CFU/mL), n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama, n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua, d = tingkat pengenceran terendah diperoleh dari pengenceran pada cawan yang pertama dihitung

Homogenat bakteri dan krioprotektan dimasukkan ke dalam tabung vial secara aseptis dengan volume larutan dalam tiap vial harus sebanyak tujuh tetes dengan pipet tetes kaca steril, kemudian dikeringbekukan pada freezer (Samsung RT53K6231 BS/SE, Korea) dengan suhu -80 °C selama ± 12 jam kemudian difreeze-drying pada suhu -40 °C selama 36-48 jam. Tabung vial yang telah difreeze-drying dipotong dengan menggunakan api secara hati-hati agar tidak ada udara dalam tabung vial tersebut.

Uji homogenitas dan stabilitas *E. coli* dan *S. Typhimurium* secara kuantitatif

Pengujian homogenitas dilakukan terhadap 10 ampul yang dipilih secara acak. Pengujian ini dilakukan sesuai dengan metode berdasarkan ISO (2001). Sebanyak 9 mL BPW disiapkan dan ditambahkan 1 mL untuk rehidrasi ampul. Pengenceran desimal dilakukan hingga 10^{-5} dengan memindahkan 1 mL ke dalam 9 mL BPW, kemudian diinokulasi 1 mL suspensi ke cawan steril secara duplo. Media TBX dituangkan pada cawan sebanyak 15 mL, dilakukan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 44 ± 2 °C,

dengan posisi cawan terbalik. Proses tersebut dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Koloni bakteri *E. coli* pada media TBX dapat terlihat berwarna hijau metalik dengan bintik hitam di bagian tengahnya (Fatiqin *et al.*, 2019). Media XLDA dituangkan pada cawan sebanyak 15 mL, dilakukan inkubasi pada suhu 35 ± 2 °C selama 18-24 jam. Koloni yang terduga *Salmonella* adalah koloni merah muda dengan atau tanpa titik mengkilat, atau terlihat hampir seluruh koloni hitam (Moraes *et al.*, 2016).

Pengujian stabilitas dilakukan pada suhu penyimpanan refrigerator yaitu suhu 4 °C, dan empat waktu (0, 7, 14, dan 65 hari), pengujian dilakukan sebanyak dua ampul dengan masing-masing kombinasi sebanyak tiga ulangan. Koloni positif dapat dihitung dengan rumus perhitungan *plate count* (BAM, 2001). Penentuan homogenitas dan stabilitas dilakukan dengan pengolahan statistik mengacu pada ISO 13528:2015.

Ekstraksi DNA *E. coli* dan *S. Typhimurium*

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *Chelex-100* sejalan dengan penelitian Nurjanah *et al.* (2018). DNA diekstraksi dari biakan semalaman menggunakan metode pereaksi *Chelex-100* (Sigma-Aldrich) dengan beberapa modifikasi, tanpa menggunakan *microwave*. Kultur terpilih dari proses homogenisasi ditumbuhkan dalam media BHIB selama semalaman pada suhu 35 °C, kemudian sebanyak 15 mL kultur bakteri disentrifugasi pada 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit, supernatannya dibuang, dan sel bakteri yang mengendap dipindahkan (sekitar 2 mL) ke tabung 2 mL. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 8000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Kemudian, supernatannya dibuang, resuspensi pelet bakteri dengan 1000 μ L *buffer* TE (10 mM TRIS-base pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) dihomogenkan dengan vorteks dan disentrifugasi lagi dalam kondisi yang sama. Sel disuspensikan kembali dalam 100 μ L *buffer* lisis TES (10 mM TRIS-base pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) dan diinkubasi pada *waterbath* (GFL 1008, Jerman) pada suhu 65 °C selama 5 menit. Setelah itu, 7,5 μ L proteinase K dan RNase A ditambahkan ke suspensi dan dilakukan inkubasi pada *waterbath* selama 5 menit pada suhu 65 °C. Setelah lisis, suspensi diinkubasi pada suhu kamar (25 °C) selama 2 menit, selanjutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit.

Supernatan yang mengandung DNA diambil dan diukur. DNA yang telah dimurnikan diendapkan dengan 0,1 volume natrium asetat 3 M pH 5,2 dan 2,5 volume dari etanol 95%. Supernatan dilakukan inkubasi pada suhu -20°C selama 20 jam. Proses ekstraksi DNA bakteri *E. coli* dilanjutkan dengan tahap DNA dicuci dengan 1 mL etanol 70% sebanyak 2 kali, dikeringkan pada suhu ruang dan dilarutkan dalam 100 μ L ddH₂O (Komalasari *et al.*, 2020), sedangkan DNA bakteri *S. Typhimurium* dilanjutkan dengan

tahap supernatan disentrifugasi 8000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit, lalu supernatannya dibuang. Akhirnya, DNA dikeringkan pada suhu kamar (25 °C), dan disuspensikan kembali dalam 75 µL NFW. DNA dikuantifikasi dengan spektrofotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Amerika).

Uji spesifisitas primer dan kondisi amplifikasi E. coli dan S. Typhimurium

Uji spesifisitas dari primer dilakukan dengan Primer BLAST yang dianalisis menggunakan (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) dan MEGA software (www.megasoftware.net). Gen primer bakteri E. coli yang digunakan dalam pengujian ini adalah gen target 16S rRNA (ECO-1 dan ECO-2) dan gen primer bakteri S. Typhimurium yang digunakan

dalam pengujian ini adalah gen target 16S rRNA pada Tabel 1. Komposisi bahan yang digunakan ditampilkan pada Tabel 2 dan kondisi amplifikasi PCR untuk bakteri E. coli dan S. Typhimurium ditunjukkan dalam Tabel 3.

Hasil reaksi pada PCR standar T100 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Amerika) dibaca menggunakan elektroforesis gel (Thermo Fisher Scientific, Amerika) 90V selama 45 menit dengan konsentrasi agarose sebesar 2% (0,7 g agarose dalam 35 mL TAE buffer). Hasil elektroforesis tersebut direndam selama 30 menit pada akuades yang telah ditambahkan 2 µL gel red. Agarose yang telah direndam kemudian ditransmisikan dengan UV transmission, sehingga pita DNA dapat diidentifikasi dan terbaca secara kualitatif.

Tabel 1. Primer yang digunakan pada deteksi E. coli dan S. Typhimurium

Table 1. Primer used in the detection of E. coli and S. Typhimurium

Bakteri dan Primer (Bacteria and Primer)	Sekuen (Sequence)	Panjang Amplikon (bp) (Amplicon Length (bp))	Referensi (Reference)
E. coli (16S rRNA)	(F): GACCTCGGTTTAGTTCACAGA (R): CACACGCTGACGCTGACCA	585	Hassan et al. (2014)
S. Typhimurium (invA)	(F): TCG TCA TTC CAT TAC CTA CC (R): AAA CGT TGA AAA ACT GAG GA	119	Mutaqin (2018)

Keterangan: F= menyimbolkan sekuen primer forward; R= menyimbolkan sekuen primer reverse
Note: F= symbolized the forward primer's sequence; R= symbolized the reverse primer's sequence

Tabel 2. Komposisi bahan dalam pengujian PCR

Table 2. Material composition in PCR testing

Bakteri (Bacteria)	Gen target (Target gene)	Komponen* (Components)	Volume (µL) (Volume (µL))	Total (µL) (Total (µL))
E. coli*	16S rRNA	DNA template E. coli	1.0-2.0	25
		Master mix	12.5	
		Primer ECO-1 (forward)	1.0-2.0	
		Primer ECO-2 (reverse)	1.0-2.0	
		NFW	6.5-9.5	
S. Typhimurium**	invA	DNA template	1	20
		Master mix/SYBR green	10	
		Primer InvA forward (F)	2	
		Primer InvA reverse (R)	2	
		NFW	7	

Keterangan (Note): *Hassan et al. (2014); **Mutaqin (2018)

Tabel 3. Kondisi amplifikasi PCR E. coli dan S. Typhimurium

Table 3. PCR amplification conditions for E. coli and S. Typhimurium

Tahap (Stage)	Suhu (°C) (Temperature (°C))		Waktu (detik) (Time (s))		Jumlah Siklus (Number of Cycles)	
	E. coli*	S. Typhimurium**	E. coli	S. Typhimurium	E. coli	S. Typhimurium
Pradenaturasi (Pre-denaturation)	95	95	180	60	1	1
Denaturasi (Denaturation)	94	95	45	15	30	35
Annealing (Annealing)	58	52	45	30		
Ekstensi (Extension)	72	72	60	35		
Ekstensi akhir (Final extension)	72	72	180	300		
Pelelehan (Melting)	-	90-60	-	0.5°C/s	-	-
End (End)	4	25	-	-	-	-

Keterangan (Note): * Hassan et al. (2014); ** Mutaqin (2018)

Pembuatan kurva standar dan limit deteksi *S. Typhimurium*

Tahapan untuk menentukan limit deteksi diawali dengan melakukan uji sensitivitas. DNA yang sebelumnya dikuantifikasi dengan spektrofotometer *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Amerika) diencerkan hingga konsentrasi akhirnya sekitar 200–0,0002 ng/μL dalam air bebas nuklease (NFW) pada suhu -20 °C (Komalasari *et al.*, 2020). Analisis sensitivitas dilihat berdasarkan konsentrasi DNA terendah yang masih dapat teramplifikasi. Penentuan sensitivitas *rt-PCR* dalam mendeteksi *S. Typhimurium* dilakukan dengan pembuatan kurva standar berdasarkan nilai Ct (*threshold cycle*) dan log konsentrasi DNA bakteri.

Kurva standar menghasilkan persamaan linear untuk mengukur limit deteksi bakteri *S. Typhimurium* dengan nilai Ct hasil amplifikasi sebagai nilai y, dan nilai antilog-nya diperoleh dari nilai persentase (x) untuk mengetahui konsentrasi DNA bakteri *S. Typhimurium* (Mutaqin, 2018).

Nilai efisiensi (E) metode *rt-PCR* dapat ditentukan dari kurva standar yang didapat, dengan cara memplotkan grafik hubungan antara nilai Ct yang diperoleh (sebagai sumbu y) dan log pengenceran DNA (sebagai sumbu x). Nilai *slope* yang dihasilkan dari grafik digunakan untuk menghitung nilai efisiensi berdasarkan Persamaan 2 (Mutaqin, 2018).

$$E = \{(10^{-1/\text{slope}}) - 1\} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efektivitas krioprotektan

Krioprotektan memainkan peran penting dalam proses liofilisasi, dapat melindungi sampel biologis dari kerusakan pada saat pembekuan (Rodrigues *et al.*, 2020). Hasil pengujian perlakuan kombinasi krioprotektan dapat dilihat pada Tabel 4. Bakteri yang tumbuh dan diduga *E. coli* pada media TBX ditandai

dengan warna hijau atau hijau kebiruan (Christanti dan Azhar, 2019), bakteri lain (*S. Typhimurium*) yang tumbuh pada media TBX memiliki warna putih keku-ningan bintik putih, sedangkan pada media XLDA bakteri yang tumbuh dan diduga *S. Typhimurium* ditandai dengan koloni warna merah muda dengan atau tanpa titik hitam (Umidayati *et al.*, 2020), bakteri lain (*E. coli*) yang tumbuh pada media XLDA memiliki warna kuning dengan bintik putih (Gambar 1).

Hasil viabilitas perlakuan krioprotektan (Tabel 4) menunjukkan bahwa perlakuan penambahan krioprotektan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap biakan kering beku dibanding tanpa melakukan penambahan krioprotektan. Hal ini sejalan dengan penelitian Farr *et al.* (2021) dan Bellali *et al.* (2020) yang menunjukkan bahwa penambahan krioprotektan sebelum proses liofilisasi dapat menghemat aktivitas enzim ke tingkat sel yang baru dipanen dan dapat mempertahankan viabilitas penyimpanan bakteri.

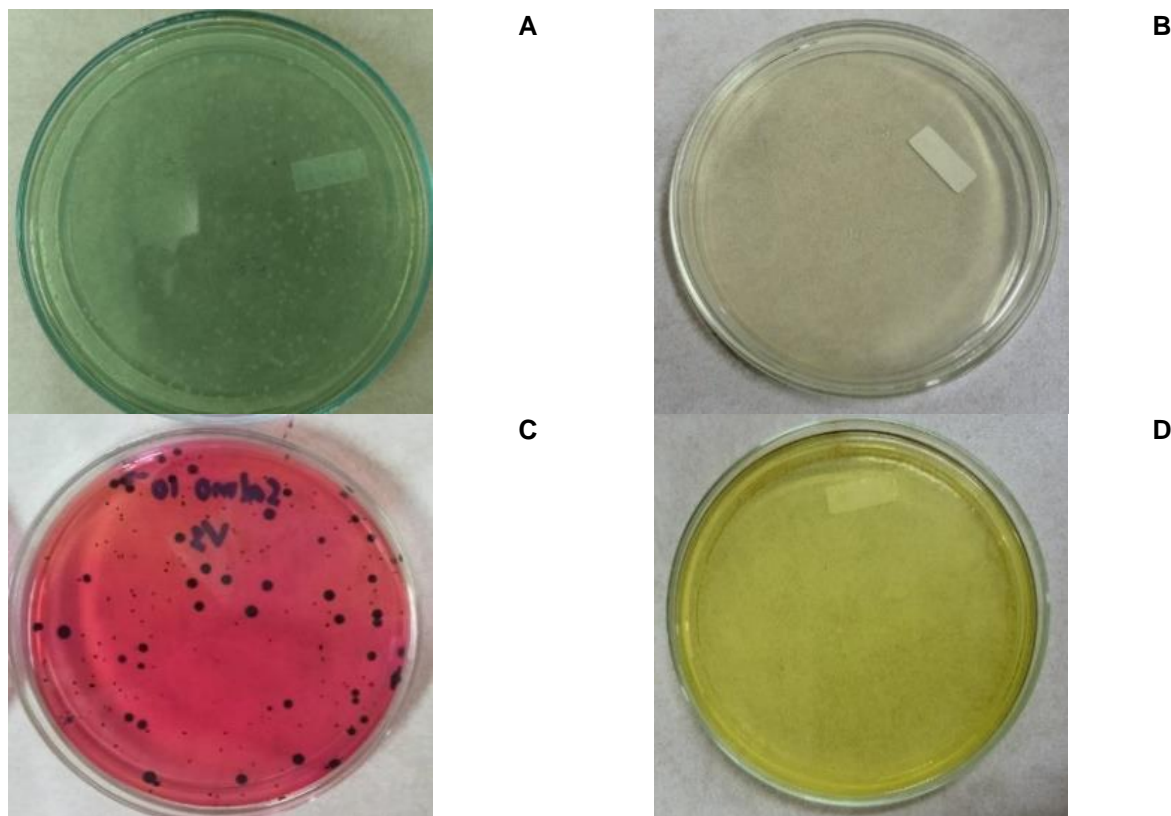
Berdasarkan Tabel 4, perlakuan kombinasi krioprotektan memberikan nilai viabilitas yang berbeda, untuk *E. coli* perlakuan 2, 3, dan 4 berada pada log yang sama yaitu 5 log CFU/mL, sedangkan hasil pengujian bakteri *S. Typhimurium* menunjukkan bahwa perlakuan 2 dan 3 menghasilkan jumlah bakteri di kisaran log yang sama yaitu 5 log CFU/mL dan berada pada subset yang sama, tetapi untuk perlakuan 4 berada pada 4 log CFU/mL berada pada subset yang berbeda, sedangkan perlakuan 1 (tanpa penambahan krioprotektan) menghasilkan populasi bakteri dengan nilai log sebesar 3 log CFU/mL, hasil ini jauh lebih rendah dibandingkan perlakuan menggunakan krioprotektan. Hal ini sesuai dengan Rodrigues *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa proses liofilisasi tanpa menggunakan media pelindung yang sesuai sangat merusak membran sel dan protein bakteri. Selain itu, kemampuan bersaing antara kedua bakteri tersebut dalam mempertahankan hidupnya dan memanfaatkan krioprotektan juga memengaruhi hasil viabilitas.

Tabel 4. Hasil rekapitulasi data viabilitas bakteri dengan perlakuan krioprotektan
 Table 4. Recapitulation results of bacterial viability with cryoprotectant treatments

Perlakuan (Treatment)	Viabilitas Awal (CFU/mL) (Initial Viability (CFU/mL))		Viabilitas Setelah Pengerinan Beku (log CFU/mL) (Viability After Freeze-Dried (log CFU/mL))	
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Kontrol (Tanpa perlakuan krioprotektan) (Control (Without cryoprotectant treatment))	(8.5±0.09)×10 ³	(8.4±0.10)×10 ³	3.93±0.05	3.93±0.06
10% Trehalosa* (10% Trehalose)	(4.5±0.28)×10 ⁵	(2.1±0.42)×10 ⁵	5.58±0.25 ^b	5.31±0.09 ^b
10% Trehalosa+10% susu skim (10% Trehalose+10% skim milk)	(1.6±0.25)×10 ⁵	(1.7±0.25)×10 ⁵	5.20±0.07 ^a	5.22±0.08 ^b
10% Trehalosa+10% sukrosa (10% Trehalose+10% sucrose)	(1.5±0.18)×10 ⁵	(9.3±0.34)×10 ⁴	5.18±0.05 ^a	4.97±0.02 ^a

Keterangan: Nilai= rata-rata±SD, (n= 3), *= perlakuan terbaik. Perbedaan notasi pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata secara signifikan (analisis Duncan ANOVA, p<0,05)

Note: Value= mean±SD, (n= 3), *= best treatment. Different superscript in the same column indicates significant different (Duncan ANOVA analysis, p<0.05)



Keterangan: Koloni *E. coli* yang ditumbuhkan pada media TBX (A), Koloni *S. Typhimurium* yang ditumbuhkan pada media TBX (B), Koloni *S. Typhimurium* yang ditumbuhkan pada media XLDA (C), Koloni *E. coli* yang ditumbuhkan pada media XLDA (D)

Note: *E. coli* colonies grown on TBX media (A), *S. Typhimurium* colonies grown on TBX media (B), *S. Typhimurium* colonies grown on XLDA (C) media, *E. coli* colonies grown on XLDA media (D)

Gambar 1. Kenampakan media TBX dan XLDA yang ditumbuhi oleh koloni *E. coli* dan *S. Typhimurium*
 Figure 1. Appearance of TBX and XLDA media overgrown with *E. coli* and *S. Typhimurium* colonies

Perlakuan krioprotektan 10% trehalosa menghasilkan viabilitas terbaik dengan nilai viabilitas untuk *E. coli* sebesar $5,58 \pm 0,25$ log CFU/mL dan *S. Typhimurium* $5,31 \pm 0,09$ log CFU/mL. Hal ini sejalan dengan penelitian Yuste *et al.* (2021) yang menjelaskan perlakuan krioprotektan trehalosa 15% merupakan krioprotektan dengan tingkat kelangsungan hidup 95% setelah 90 hari serta paling efektif dibandingkan dengan susu skim, maltodekstrin, sukrosa, dengan hasil yang paling stabil karena konsentrasi probiotik dalam suspensi di krioprotektan ini tidak menunjukkan penurunan signifikan dari waktu ke waktu. Menurut Stefanello *et al.* (2018), penambahan trehalosa 10 dan 15% ke dalam kultur sebelum freeze-drying memiliki efek krioprotektif terhadap kelangsungan hidup mikroorganisme, dan efek tersebut berbanding lurus dengan konsentrasi trehalosa yang ditambahkan.

Perlakuan trehalosa 10% ini memiliki hasil viabilitas yang lebih tinggi dan memiliki selisih yang paling dekat dengan hasil viabilitas sebelum liofilisasi dibanding perlakuan pencampuran krioprotektan

trehalosa dengan susu maupun sukrosa. Proses liofilisasi ini mengakibatkan penurunan viabilitas pada sel bakteri, penurunan viabilitas kedua bakteri tersebut sebanyak ± 4 log (10^9 menjadi 10^5) CFU/mL diakibatkan adanya proses pengeringan beku atau liofilisasi yang menyebabkan rusaknya sel bakteri.

Homogenitas *E. coli* dan *S. Typhimurium*

Hasil uji homogenitas secara kuantitatif *E. coli* dan *S. Typhimurium* dengan metode *plate count* menunjukkan hasil yang homogen berdasarkan perhitungan ISO (2015). Uji homogenitas dikatakan homogen apabila nilai *standard deviation between samples* (Ss) lebih kecil dibandingkan $0,3\sigma_{pt}$. Hasil uji bakteri *E. coli* homogen (Tabel 5).

Hasil uji homogenitas bakteri *E. coli* dari 10 ampul menunjukkan hasil yang homogen (Tabel 6). ketika kriteria ini dipenuhi, standar deviasi antara sampel memberikan kontribusi kurang dari 10% varians untuk evaluasi kinerja, sehingga evaluasi kinerja tidak mungkin terpengaruh (ISO, 2015).

Tabel 5. Hasil pengolahan data homogenitas biakan kering beku *E. coli* secara kuantitatif
 Table 5. Quantitative results of homogeneity data of freeze-dried *E. coli* cultures

Sampel (Sample)	a	b	\bar{x}_t	$\bar{x}_r \pm SD$	$ \bar{x}_t - \bar{x}_r $	$(\bar{x}_t - \bar{x}_r)^2$	w_t	w_t^2
1	5.72	5.58	5.65	5.28±0.20	0.37	0.14	0.14	0.02
2	5.07	5.01	5.04		0.24	0.06	0.06	0.00
3	5.44	5.39	5.42		0.14	0.02	0.05	0.00
4	5.22	5.15	5.19		0.09	0.01	0.07	0.00
5	5.69	5.43	5.56		0.28	0.08	0.26	0.07
6	5.10	5.01	5.05		0.23	0.05	0.09	0.01
7	5.15	5.06	5.11		0.18	0.03	0.09	0.01
8	5.36	5.33	5.35		0.07	0.00	0.03	0.00
9	5.36	5.12	5.24		0.04	0.00	0.24	0.06
10	5.28	5.14	5.21		0.07	0.00	0.14	0.02
							s_x	0.21
							s_s	0.10
							s_s	0.20
							σ_{pt}	1.06*
							$0.3\sigma_{pt}$	0.32
							Sampel dikatakan homogen apabila: (The sample is said to be homogeneous if)	$s_s \leq 0.3\sigma_{pt}$ 0.20 ≤ 0.32
							Kesimpulan: (Conclusion)	Homogen (Homogeneous)

Keterangan: \bar{x}_t = rata-rata dari nilai log CFU terbesar (a) dengan nilai log CFU terkecil (b), \bar{x}_r = rata-rata umum, w_t = selisih dari nilai a dan b, s_x = standar deviasi dari rata-rata sampel, s_w = standar deviasi dalam kelompok sampel, s_s = standar deviasi antar kelompok sampel, σ_{pt} = standar deviasi untuk uji profisiensi ($\times 0,20$ rata-rata umum)
 Note: \bar{x}_t = average of the largest CFU log value (a) and the smallest CFU log value (b), \bar{x}_r = general average, w_t = the difference between the values a and b, s_x = standard deviation of the sample mean, s_w = standard deviation within samples, s_s = standard deviation between samples, σ_{pt} = standard deviation for proficiency test ($\times 0.20$ general average)

Tabel 6. Hasil pengolahan data homogenitas biakan kering beku *S. Typhimurium* secara kuantitatif
 Table 6. Quantitative results of homogeneity data of freeze-dried *S. Typhimurium* cultures

a	b	\bar{x}_t	$\bar{x}_r \pm SD$	$ \bar{x}_t - \bar{x}_r $	$(\bar{x}_t - \bar{x}_r)^2$	w_t	w_t^2	
1	5.98	5.97	5.98	5.59±0.28	0.37	0.14	0.14	0.02
2	5.36	5.25	5.30		0.24	0.06	0.06	0.00
3	5.85	5.84	5.85		0.14	0.02	0.05	0.00
4	5.76	5.70	5.73		0.09	0.01	0.07	0.00
5	5.94	5.92	5.93		0.28	0.08	0.26	0.07
6	5.38	5.33	5.35		0.23	0.05	0.09	0.01
7	5.30	5.28	5.29		0.18	0.03	0.09	0.01
8	5.38	5.33	5.35		0.07	0.00	0.03	0.00
9	5.39	5.23	5.31		0.04	0.00	0.24	0.06
10	5.87	5.83	5.85		0.07	0.00	0.14	0.02
							s_x	0.29
							s_s	0.05
							s_s	0.29
							σ_{pt}	1.12*
							$0.3\sigma_{pt}$	0.34
							Sampel dikatakan homogen apabila: (The sample is said to be homogeneous if)	$s_s \leq 0.3\sigma_{pt}$ 0.29 ≤ 0.34
							Kesimpulan: (Conclusion)	Homogen (Homogeneous)

Keterangan: \bar{x}_t = rata-rata dari nilai log CFU terbesar (a) dengan nilai log CFU terkecil (b), \bar{x}_r = rata-rata umum, w_t = selisih dari nilai a dan b, s_x = standar deviasi dari rata-rata sampel, s_w = standar dalam kelompok sampel, s_s = standar deviasi antar kelompok sampel, σ_{pt} = standar deviasi untuk uji profisiensi ($\times 0,20$ rata-rata umum)
 Note: \bar{x}_t = average of the largest CFU log value (a) and the smallest CFU log value (b), \bar{x}_r = general average, w_t = the difference between the values a and b, s_x = standard deviation of the sample mean, s_w = standard deviation within samples, s_s = standard deviation between samples, σ_{pt} = standard deviation for proficiency test ($\times 0.20$ general average)

Stabilitas *E. coli* dan *S. Typhimurium*

Hasil uji stabilitas biakan kering beku secara kuantitatif bakteri *E. coli* (Tabel 7) dan *S. Typhimurium* (Tabel 8) dengan metode *plate count* menunjukkan hasil yang stabil pada penyimpanan suhu 4 °C selama 65 hari berdasarkan perhitungan ISO (2015). Hal ini sesuai dengan penelitian Shahba *et al.* (2016) yang melaporkan bahwa *freeze-drying* memberikan potensi untuk penyimpanan kultur kering beku pada suhu 4 °C, untuk mengawetkan spermatozoa dari hewan.

Pengujian homogenitas dan stabilitas menunjukkan bahwa jumlah koloni bakteri *S. Typhimurium* lebih dominan tumbuh dibanding jumlah koloni bakteri *E. coli*. Bakteri *S. Typhimurium* memiliki kurva pertumbuhan dimulai dengan konsentrasi awal hampir 2 log CFU/g dan mencapai konsentrasi akhir 8 log

CFU/g, setelah 10 jam pada suhu 37 °C. Bakteri *E. coli* memiliki kurva pertumbuhan dimulai dengan konsentrasi awal hampir 4 log CFU/g dan mencapai konsentrasi akhir 7 log CFU/g setelah 8 jam pada suhu 37 °C (Veys *et al.*, 2016).

Kemurnian DNA sampel *E. coli* dan *S. Typhimurium* hasil ekstraksi

Ekstraksi DNA merupakan tahapan yang penting dalam analisis DNA menggunakan metode PCR, karena menjadi titik kritis yang dapat memengaruhi hasil analisis (Mutaqin, 2018). Kemurnian dan konsentrasi DNA hasil ekstraksi sampel kultur murni (BHIB) dan sampel uji menggunakan *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Amerika) disajikan pada Tabel 9.

Tabel 7. Hasil pengolahan data stabilitas *E. coli* (ISO 13528:2015)
 Table 7. Results of processing of *E. coli* stability data (ISO 13528:2015)

Pengujian (Hari) (Testing (Days))	Sampel (Sample)	a	b	\bar{V}_r	\bar{x}_r	$ \bar{V}_r - \bar{x}_r $	$0.3\sigma_{pt}$
0	C1	5.01	5.00	5.00	5.28	0.28	≤ 0.32
	C2	5.60	5.39	5.49		0.21	≤ 0.32
7	C3	5.19	5.09	5.15		0.13	≤ 0.32
	C4	5.59	5.41	5.50		0.22	≤ 0.32
14	C5	5.12	5.05	5.09		0.20	≤ 0.32
	C6	5.27	5.22	5.25		0.04	≤ 0.32
65	C7	5.40	5.19	5.30		0.01	≤ 0.32
	C8	5.32	5.32	5.33		0.13	≤ 0.32
Sampel dikatakan stabil apabila: (The sample is said to be stable if)						$ \bar{V}_r - \bar{x}_r $	≤ 0.3 σ_{pt}
Kesimpulan: (Conclusion)						Stabil (Stable)	

Keterangan: \bar{V}_r = rata-rata nilai log CFU terbesar (a) dan nilai log CFU terkecil (b), \bar{x}_r = rata-rata umum, σ_{pt} = standar deviasi uji profisiensi

Note: \bar{V}_r = average of the largest CFU log values (a) and the smallest CFU log values (b), \bar{x}_r = general average, σ_{pt} = standard deviation of proficiency test

Tabel 8. Hasil pengolahan data stabilitas *S. Typhimurium* sesuai dengan ISO 13528:2015
 Table 8. Results of processing of *S. Typhimurium* stability data according to ISO 13528:2015

Pengujian (Hari) (Testing (Days))	Sampel (Sample)	a	b	\bar{V}_r	\bar{x}_r	$ \bar{V}_r - \bar{x}_r $	$0.3\sigma_{pt}$
0	T1	5.86	5.81	5.84	5.59	0.24	≤ 0.34
	T2	5.95	5.90	5.92		0.33	≤ 0.34
7	T3	5.90	5.86	5.88		0.29	≤ 0.34
	T4	5.94	5.93	5.94		0.34	≤ 0.34
14	T5	5.44	5.34	5.39		0.20	≤ 0.34
	T6	5.52	5.49	5.50		0.09	≤ 0.34
65	T7	5.68	5.65	5.66		0.07	≤ 0.34
	T8	5.91	5.87	5.89		0.30	≤ 0.34
Sampel dikatakan stabil apabila: (The sample is said to be stable if)						$ \bar{V}_r - \bar{x}_r $	≤ 0.3 σ_{pt}
Kesimpulan: (Conclusion)						Stabil (Stable)	

Keterangan: \bar{V}_r = rata-rata nilai log CFU terbesar (a) dan nilai log CFU terkecil (b), \bar{x}_r = rata-rata umum, σ_{pt} = standar deviasi uji profisiensi

Note: \bar{V}_r = average of the largest CFU log values (a) and the smallest CFU log values (b), \bar{x}_r = general average; σ_{pt} = standard deviation of proficiency test

Tabel 9. Hasil pembacaan konsentrasi DNA pada spektrofotometer NanoDrop 2000
 Table 9. Results of DNA concentration readings on the NanoDrop 2000 spectrophotometer

Bakteri (Bacteria)	\bar{x} Konsentrasi DNA \pm SD (\bar{x} Concentration DNA \pm SD)	\bar{x} A ₂₆₀ /A ₂₈₀ \pm SD (\bar{x} A ₂₆₀ /A ₂₈₀ \pm SD)
Kultur murni (Pure culture)	<i>E. coli</i> 1068.75 \pm 4.25	1.80 \pm 0.01
	<i>S. Typhimurium</i> 2762.80 \pm 2.1	1.89 \pm 0.00
Sampel uji (Test sample)	<i>E. coli</i> 11.85 \pm 0.05	0.9 \pm 0.02
	<i>S. Typhimurium</i> 2.15 \pm 0.15	1.24 \pm 0.17

Keterangan: A₂₆₀/A₂₈₀= kemurnian DNA yang terbaca pada absorbansi 260 dan 280 nm

Note: A₂₆₀/A₂₈₀= DNA purity read at absorbance of 260 and 280 nm

DNA murni harus bebas dari protein dan oligopeptide dengan nilai absorbansi 1,8 hingga 2,0 pada panjang gelombang 260/280 (Dewanata dan Mushih, 2021). Berdasarkan Tabel 9, kultur murni *E. coli* dan *S. Typhimurium* masing-masing memiliki rata-rata konsentrasi sebesar 1068,75 \pm 4,25 dan 2762,8 \pm 2,1 ng/ μ L dan nilai absorbansi \geq 1,8 yang menandakan bahwa DNA hasil ekstraksi tersebut murni. Namun, pada sampel uji *E. coli* dan *S. Typhimurium* memiliki rasio absorbansi 260/280 nm memberikan hasil <1,8. Hal tersebut menyatakan bahwa DNA sampel *E. coli* dinyatakan tidak murni. Nilai kemurnian <1,8 mengindikasikan bahwa DNA sampel terkontaminasi oleh protein dan polisakarida dan apabila nilai absorbansinya lebih dari 2,0 DNA terkontaminasi RNA (Dewanata dan Mushih, 2021).

Spesifisitas primer *E. coli* dan *S. Typhimurium*

Hasil elektroforesis pada Gambar 2 menunjukkan adanya pita DNA *E. coli* dengan *base pair* sebesar 585 bp menggunakan gen target 16S rRNA dan adanya pita DNA *S. Typhimurium* dengan *base pair* sebesar 119 bp menggunakan gen target *invA*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kecocokan 100% dari primer *forward* (ECO-1) dan *reverse* (ECO-2) dapat mendeteksi adanya bakteri *E. coli* dan tidak dapat mendeteksi bakteri *S. Typhimurium*. Hasil kecocokan 100% dari primer *forward* dan *reverse* primer *invA* dapat mendeteksi adanya bakteri *S. Typhimurium* dan tidak mendeteksi bakteri *E. coli*. Pita yang dihasilkan menunjukkan adanya perbedaan ketebalan pada sampel perlakuan 2, 3, dan 4 dikarenakan adanya perbedaan kemurnian DNA yang dapat diperhatikan pada hasil pengujian menggunakan *NanoDrop*.

Hasil elektroforesis menunjukkan tidak adanya *mispriming* pada pengujian, primer yang digunakan telah terbukti spesifik mengamplifikasi gen target dan tidak mendeteksi gen lain. *Mispriming* adalah penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan (Sasmitha *et al.*, 2018). Tidak adanya *mispriming* atau terbentuknya pita pada *base pair* yang tidak sesuai menunjukkan kondisi *running* PCR yang baik (McCall *et al.*, 2014). Uji spesifisitas primer *InvA* 119 bp menghasilkan kurva amplifikasi yang baik terdeteksi hingga hingga siklus ke-30, hal ini menandakan kondisi *running* yang digunakan sudah sesuai dan

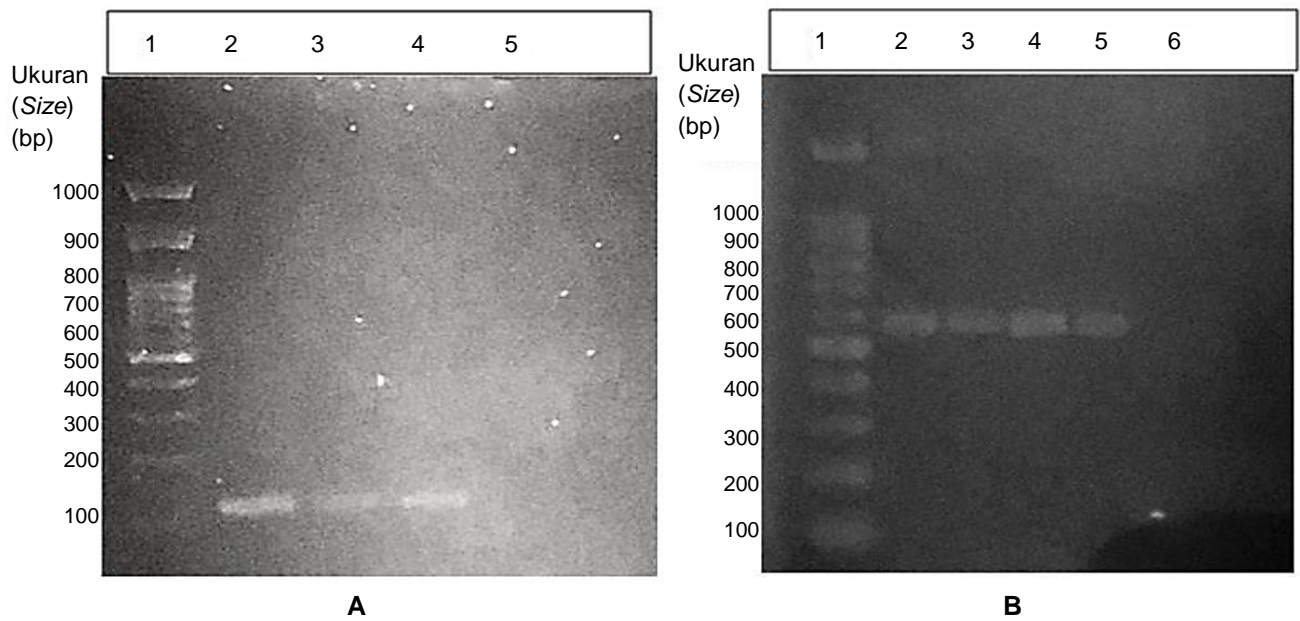
baik. Nilai T_m yang dihasilkan dari kurva pelelehan sampel *S. Typhimurium* sebesar 78,5 °C (Gambar 3).

Kurva standar dan limit deteksi DNA *S. Typhimurium*

Sensitivitas deteksi suatu metode ditunjukkan dengan nilai pengenceran tertinggi yang masih dapat teramplifikasi (Mutaqin, 2018). Kuantifikasi melalui PCR dapat dicapai dengan menggunakan kurva standar, yang dibuat dengan mengamplifikasi jumlah DNA target yang diketahui dalam kelompok paralel reaksi yang dijalankan di bawah kondisi yang identik dengan sampel. Akurasi kuantitatif kurva bergantung dari akurasi kuantifikasi standar DNA dan kualitas penyusun kurva standar. Salah satu komponen penting dalam kurva standar adalah nilai Ct. Nilai Ct merupakan jumlah siklus yang diperlukan agar sinyal fluoresen mencapai ambang batas yang telah ditentukan dalam *rt*-PCR. Nilai Ct dapat digunakan untuk menentukan batas deteksi, oleh karena itu nilai Ct yang paling rendah atau waktu terpendek untuk mendeteksi menunjukkan kapasitas deteksi yang baik. Nilai Ct juga memiliki korelasi dengan jumlah sel atau konsentrasi target bakteri dalam sampel, jika jumlah sel bakteri yang ada sampel semakin banyak, maka sinyal fluoresen akan mencapai ambang batas lebih cepat, sehingga nilai Ct akan lebih rendah (Nurjanah *et al.*, 2018).

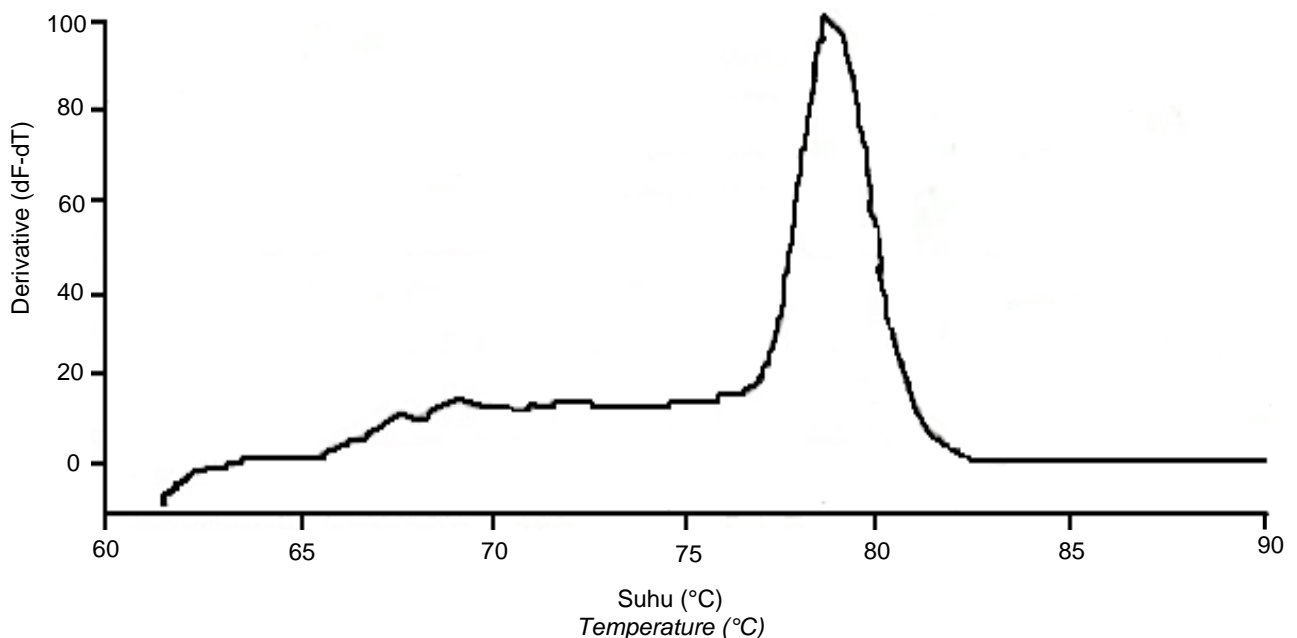
Pembuatan kurva standar bakteri *S. Typhimurium* diawali dengan pengenceran hasil ekstraksi DNA hingga 1/1.000.000 (konsentrasi 2762,8–0,0028 ng/ μ L), kemudian semuanya diamplifikasi dengan *real-time* PCR bersamaan dengan sampel. Hasil nilai Ct pada kultur murni dan sampel uji *S. Typhimurium* (Tabel 10) menunjukkan bahwa konsentrasi *S. Typhimurium* semakin besar maka semakin kecil nilai Ct yang dihasilkan. Semakin tingginya konsentrasi target DNA dalam sampel, maka semakin banyak DNA yang akan terekstraksi maka semakin rendah nilai Ct yang diperlukan untuk mencapai ambang batas fluoresensi.

Kurva standar analisis *real-time* PCR untuk *S. Typhimurium* dengan gen *InvA* sebagai primer dibuat dengan memplot log konsentrasi DNA sebagai sumbu X dan nilai Ct yang terbaca sebagai sumbu Y (Gambar 4).



Keterangan: A (1) DNA ladder, (2) sampel *S. Typhimurium* P, (3) sampel *S. Typhimurium* Y, (4) sampel *S. Typhimurium* L, (5) kontrol negatif; B (1) DNA ladder, (2) sampel *E. coli* P1, (3) sampel *E. coli* P2, (4) sampel *E. coli* Y1, (5) sampel *E. coli* K, (6) kontrol negatif
Note: A (1) DNA ladder, (2) samples of *S. Typhimurium* P, (3) samples of *S. Typhimurium* Y, (4) samples of *S. Typhimurium* L, (5) negative control; B (1) DNA ladder, (2) *E. coli* P1 samples, (3) *E. coli* P2 samples, (4) *E. coli* Y1 sample, (5) *E. coli* K sample, (6) negative control

Gambar 2. Hasil pembacaan pita DNA *S. Typhimurium* hasil elektroforesis
Figure 2. Results of electrophoretic *S. Typhimurium* DNA band readings

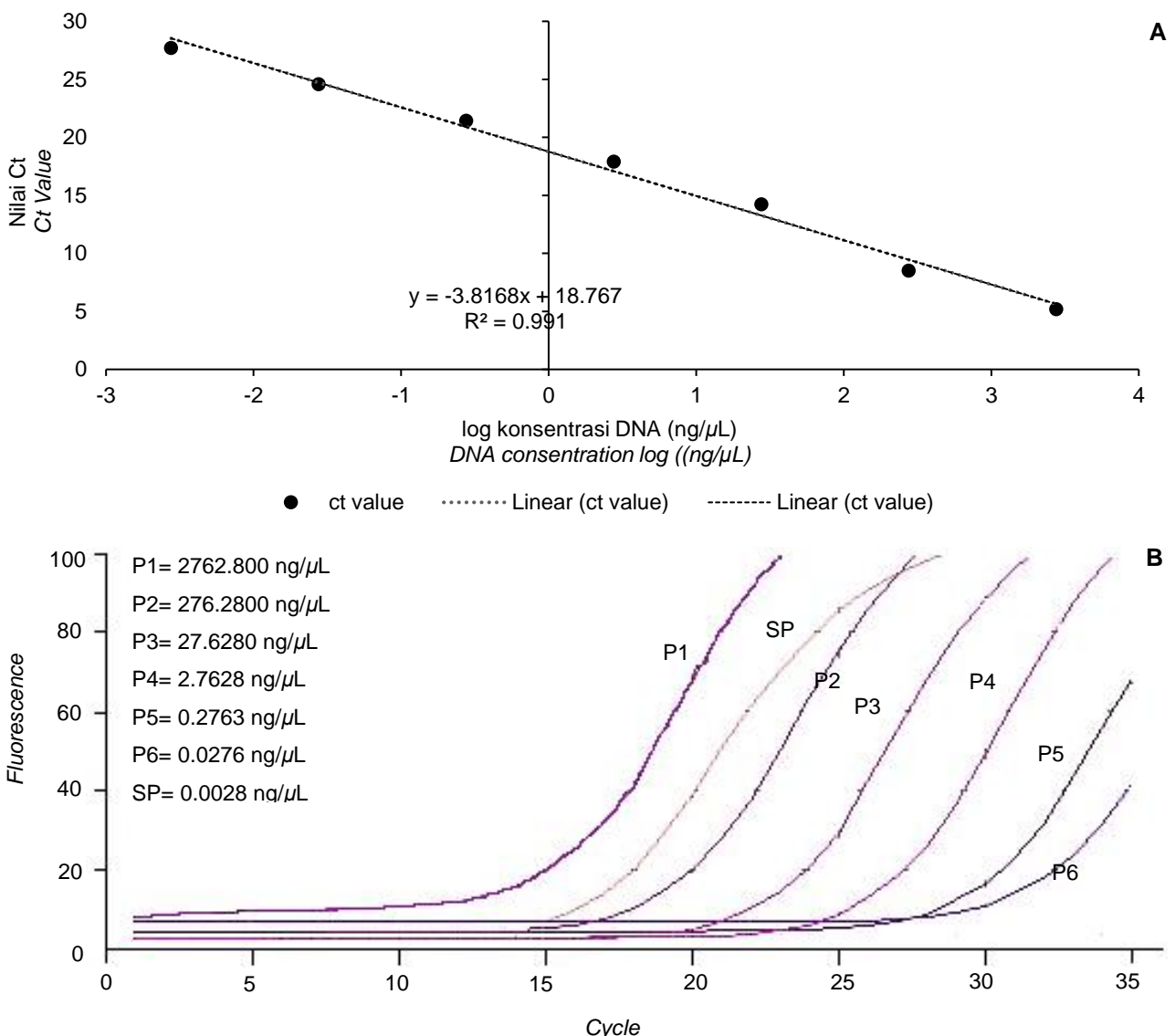


Gambar 3. Kurva pelelehan *S. Typhimurium* dengan *real-time* PCR
Figure 3. *S. Typhimurium* melting curve with *real-time* PCR

Tabel 10. Hasil pembacaan nilai Ct pada *S. Typhimurium*
 Table 10. Results of Ct readings on *S. Typhimurium*

Bakteri (Bacteria)	Konsentrasi DNA (ng/μL) (Concentration DNA ((ng/μL))	log Konsentrasi DNA (DNA Concentration log)	Ct (Ct)	Tm (°C) (Tm (°C))
Kultur murni (Pure culture)	2762.8000	3.44	5.20	78.5
	276.2800	2.44	8.51	78.5
	27.6280	1.44	14.23	78.5
	2.7628	0.44	17.91	78.5
	0.2763	-0.56	21.44	78.5
	0.0276	-1.56	24.59	78.5
	0.0028	-2.56	27.70	78.5
Sampel uji (Test sample)	23.99*	1.38*	13.50	78.5

Keterangan: *= konsentrasi DNA sampel dihitung melalui persamaan regresi linear. Ct= threshold cycle, Tm= suhu leleh
 Note: *= the DNA concentration of sample is calculated using a linear regression equation. Ct= threshold cycle, Tm= melt temperature



Keterangan: Kurva standar (A); kurva deteksi (B) *S. Typhimurium*
 Note: Standard curve (A); detection curve (B) *S. Typhimurium*

Gambar 4. Kurva standar dan deteksi *S. Typhimurium* dengan *real-time* PCR
 Figure 4. Standard and detection curve of *S. Typhimurium* by *real-time* PCR

Berdasarkan hasil plot tersebut pada *Microsoft Excel 2021*, diperoleh persamaan regresi linear $y = -3,8168x + 18,767$. Nilai konsentrasi DNA bakteri *S. Typhimurium* yang diperoleh dari persamaan regresi sebesar $23,99 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (Tabel 10). Nilai efisiensi yang diperoleh dari kurva standar deteksi *S. Typhimurium* adalah sebesar 82,81%.

Suatu primer dikatakan memiliki efisiensi yang tinggi apabila nilai efisiensi yang diperoleh berkisar 90–110%. Nilai efisiensi didefinisikan sebagai fraksi dari target gen yang telah teramplifikasi dalam satu siklus *rt-PCR*. Oleh karena itu, nilai *Ct* yang diperoleh mewakili jumlah *template* DNA yang sebenarnya ketika nilai efisiensi mendekati 100%. Nilai efisiensi *rt-PCR* yang diperoleh dipengaruhi oleh jenis instrumen yang digunakan. Selain itu, *pipetting error* pada saat pengenceran DNA juga memengaruhi nilai efisiensi yang diperoleh. Nilai *slope* pada kurva standar dapat diterima jika nilainya berkisar dari -3,1 sampai -3,5 dengan nilai koefisien regresi antara 0,990-1,000 (Mutaqin, 2018). Nilai regresi (R^2) yang diperoleh sebesar 0,991 menunjukkan bahwa efisiensi dari amplifikasi target gen yang dilakukan bersifat konstan dan nilai yang diperoleh reliabel. Berdasarkan hasil efisiensi dan gradien kurva, maka diperlukan pengulangan pada pembuatan kurva standar agar mendapatkan hasil yang lebih akurat.

Hasil pembacaan dapat dianalisis secara kualitatif dengan melihat kenaikan pada kurva deteksi (Gambar 4) yang menunjukkan bahwa semua DNA yang diamplifikasi adalah DNA *S. Typhimurium* karena terjadi kenaikan kurva. Konsentrasi DNA sampel uji *S. Typhimurium* sebesar $23,99 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (Tabel 10) dan setelah dikonversi ke dalam *copy number* didapatkan nilai sebesar $6,65 \text{ log copies}$, lebih besar dibandingkan jumlah koloni pada metode *plate count* sebesar $(5,31 \pm 0,09) \text{ log CFU/mL}$ dengan selisih 1,34 log. Perbedaan selisih antara hasil pencawanan dengan pembacaan *rt-PCR* disebabkan oleh adanya bakteri *S. Typhimurium* dalam kondisi *viable but non-culturable* (VBNC). Bakteri tersebut tidak dapat ditumbuhkan pada media pertumbuhan konvensional (XLDA) namun bakteri tersebut tetap hidup dan dapat mempertahankan viabilitas dan menunjukkan virulensinya. Bakteri VBNC dapat dire-susitasi jika diberikan kondisi yang sesuai. Dalam keadaan VBNC, aktivitas metabolisme dapat diukur, sedangkan dalam keadaan tidak aktif, aktivitas ini harus tetap di bawah tingkat deteksi, hal ini menyebabkan perkiraan kepadatan populasinya terlalu rendah (Ramamurthy *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Krioprotektan yang terbaik untuk pengujian ini adalah menggunakan 10% trehalosa, dengan viabilitas *E. coli* sebesar $5,58 \pm 0,25 \text{ log CFU/mL}$ dan

S. Typhimurium $5,31 \pm 0,09 \text{ log CFU/mL}$. Sampel biakan kering beku *E. coli* dan *S. Typhimurium* menghasilkan hasil yang homogen dan stabil pada suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sehingga dapat digunakan sebagai objek uji profisiensi. Bakteri *E. coli* dapat dikonfirmasi dengan baik menggunakan primer 16S rRNA menghasilkan pita ukuran 585 bp pada PCR standar. Bakteri *S. Typhimurium* dapat dikonfirmasi dengan baik menggunakan primer *invA* ukuran 119 bp pada PCR standar, dan menghasilkan persamaan regresi linear $y = -3,8168x + 18,767$ pada *rt-PCR*. Nilai konsentrasi DNA bakteri *S. Typhimurium* yang diperoleh dari persamaan regresi sebesar $23,99 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dan nilai efisiensi sebesar 82,81%. Jumlah koloni pada metode *plate count* lebih sedikit dibandingkan dengan perkiraan jumlah bakteri hasil pembacaan *rt-PCR* dengan selisih $1,34 \text{ log CFU/mL}$. Perbedaan selisih antara hasil pencawanan dengan pembacaan *rt-PCR* disebabkan oleh adanya bakteri *S. Typhimurium* dalam kondisi *viable but non-culturable* (VBNC). Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemilihan komposisi primer, agar dapat mendeteksi bakteri *E. coli* menggunakan *rt-PCR* dan perlu pengulangan pembuatan kurva standar untuk bakteri *S. Typhimurium* agar memperoleh nilai efisiensi dan gradien kurva dengan hasil yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Alajmi, R. Z., Alfauzan, W. A., & Mustafa, A. S. (2023). The prevalence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* among neonates in Kuwait. *Diagnostics (Basel)*, *13*(8), 1505. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081505>
- Bellali, S., Khalil, J. B., Fontanini, A., Raoult, D., & Lagier, J. C. (2020). A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, *236*, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>
- Christanti, S. D., & Azhar, M. H. (2019). Identifikasi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp. pada produk beku perikanan di Balai Karantina Ikan, pengendalian mutu, dan keamanan hasil perikanan Surabaya II, Jawa Timur. *Journal of Aquaculture Science*, *4*(2), 62–72. <https://doi.org/10.31093/joas.v4i2.69>
- Cui, S., Hu, K., Qian, Z., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J., Tang, X., & Zhang H. (2022). Improvement of freeze-dried survival of *Lactiplantibacillus plantarum* based on cell membrane regulation. *Microorganisms*, *10*(10), 1985. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101985>
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA purity test using UV-Vis spectrophotometer and nanoprop spectrophotometer in type 2

- diabetes mellitus patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15(2021), 1–10. <https://doi.org/10.21070/ijins.v15i.553>
- Farr, T., Wissner, J. L., & Hauer, B. (2021). A simple and efficient method for lyophilization of recombinant *E. coli* JM109 (DE3) whole-cells harboring active Rieske non-heme iron dioxygenases. *MethodsX*, 8, 101323. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101323>
- Fatiqin, A., Novita, R., & Apriani, I. (2019). Pengujian *Salmonella* menggunakan media SSA dan *E. coli* menggunakan media TBX pada bahan pangan. *Jurnal Indobiosains*, 1(1), 22–29.
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon. (2019). Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jeniikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11–21.
- Hassan, J., Parvej, S., Rahman, B., Khan, R., Rahman, T., Kamal, T., & Nazir, N. H. (2014). Prevalence and characterization of *Escherichia coli* from rectal swab of apparently healthy cattle in Mymensingh, Bangladesh. *Microbes and Health*, 3(1), 12–14.
- [ISO] International Organization for Standardization. (2001). ISO 16649-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. International Organization for Standardization, Jenewa.
- [ISO] International Organization for Standardization. (2010). ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment – General requirements for proficiency testing. International Organization for Standardization, Jenewa.
- [ISO] International Organization for Standardization. (2015). ISO 13528: 2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. International Organization for Standardization, Jenewa.
- [KAN] Komite Akreditasi Nasional. (2022). Direktori Penyelenggara Uji Profisiensi. <https://kan.or.id/index.php/documents/terakreditasi/doc17020/sni-iso-iec-17043/penyelenggara-uji-profisiensi> [20 Oktober 2022].
- Kusuma, G. D., Barabadi, M., Tan, J. L., Morton, D. A. V., Frith, J. E., & Lim, R. (2018). To protect and to preserve: Novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1199. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01199>
- Komalasari, E. (2017). Pengembangan metode multipleks *real-time* PCR untuk deteksi *Escherichia coli* patogenik pada es batu [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mutaqin, L. A. (2018). Mendeteksi serotyping *Salmonella* Hadar, *S. Typhimurium*, dan *S. Enteritidis* menggunakan *real time polymerase chain reaction* [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Moraes, D. M. C., Duarte, S. C., Bastos, T. S. A., Rezende, C. L. G., Leandro, N. S. M., Café, M. B., Stringhini, J. H., & Andrade, M. A. (2016). Detection of *Salmonella* spp. by conventional bacteriology and by quantitative polymerase chain reaction in commercial egg structures. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18(1), 117–124. <https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0063>
- McCall, C. M., Mosier, S., Thiess, M., & Debeljak, M. (2014). False positives in multiplex PCR-based next-generation sequencing have unique signatures. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(5), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.06.001>
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana, B. M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freezing drying - An review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87–98.
- Nurjanah, S., Rahayu, W. P., & Mutaqin L. A. (2018). Detection method for *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis using real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(4.14), 302–306. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i4.14.27661>
- Oktarina, E. (2021). Uji profisiensi agregat dan beton untuk penerapan SNI 17025. *Jurnal Rekayasa*, 11(2), 168–183. <https://doi.org/10.37037/jrftsp.v11i2.120>
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. 2013. *FEMS Microbiol Letters*, 339(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>
- Rodrigues, R. B., Uczay, M., Brito, V. B., Fossati, A. A. N., Godoy, A. C., Moura, D. J., Vogel, C. I. G., Vasconcelos, C. A. N., Jr, D. P. S. (2020). Skim milk powder used as a non-permeable cryoprotectant reduces oxidative and DNA damage in cryopreserved zebrafish sperm. *Cryobiology*, 97, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.005>
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., & Yowani, S. C. (2018). Desain DNA primer secara *in silico* sebagai pendeteksi mutasi gen *gyrA*

- Mycobacterium tuberculosis* untuk metode *polymerase chain reaction*. *Cakra Kimia [Indonesian E-Journal of Applied Chemistry]*, 6(1), 63–69.
- Shahba, M. I., El-Sheshtawy, R. I., Abdel-Salam, I., El-Azab A. S., Abdel-Ghaffar A. E., Ziada, M. S., & Zaky, A. A. (2016). The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6), 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.11.002>
- Stefanello, E. F., Machado, A. A. R., Cavalheiro, C. P., Santos, M. L., Nabeshima, E. H., Copetti, M. V., & Fries, L. L. M. (2018). Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production. *LWT-Food Science and Technology*, 89(2018), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.011>
- Umidayati, Rahardjo, S., Ilham, & Mulyono, M. (2020). Identifikasi *Salmonella* sp. pada cacing sutra (*Tubifex* sp.) tangkapan dari alam dan hasil budidaya. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(2), 122–130. <https://doi.org/10.20473/jafh.v9i2.16139>
- Veys, O., Elia, S. O., Sampers, I., & Tondo, E. C. (2016). Modelling the growth of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 on lettuce. *Procedia Food Science*, 7, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.10.003>
- Yuste, A., Arosemena, E. L., & Calvo, M. A. (2021). Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant. *Scientific Reports*, 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98723-0>