



Identifikasi *Bacillus* sp. Pada Makanan Ringan berbasis Umbi-umbian Melalui Analisis Molekuler Gen Toxin Hbl dan Nhe

Identification of Bacillus sp. On Tuber-Based Snacks Through Molecular Analysis of Hbl and Nhe Toxin Genes

^{1)*} Eunike Marganingrum Andriani Samodra, ²⁾ Angelia Wattimury, ³⁾ Tri Yahya Budiarmo, ⁴⁾ Charis Amarantini

¹Politeknik Santo Paulus Surakarta, Surakarta, Indonesia

²³⁴Universitas Kristen Duta Wacana, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia

Email: eunikeandriani0708@gmail.com

*Correspondence: Eunike Marganingrum Andriani Samodra

DOI:

10.59141/comserva.v4i5.1294

ABSTRAK

Foodborne disease atau penyakit yang disebabkan karena konsumsi makanan dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme. Salah satu mikroorganismenya adalah *Bacillus cereus* sebagai bakteri gram positif dan fakultatif anaerob yang dapat mencemari dari lingkungan mampu melakukan pemulihan dari makanan dan bahan pangan yang lain. Hal yang membuat *Bacillus* sp. Dapat bertahan di kondisi ekstrem adalah keberadaan spora terutama saat berada di bahan pangan yang sudah dikeringkan atau dibuat dalam bentuk bubuk. Kasus kontaminasi kelompok *Bacillus cereus* yang mendatangkan foodborne illness ditemukan dalam produk kentang. *Bacillus cereus* dan terkonsumsi dapat memberikan dampak terhadap sakit pencernaan berupa sakit perut dan diare tidak berdarah yang terjadi 4 - 16 jam setelah konsumsi. Gejala-gejala tersebut disebabkan oleh produksi diarrheal toxin hemolysin BL, Hbl, enterotoksin nonhemolitik Nhe dan sitotoksin CytK pada usus manusia. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi *Bacillus* sp. Pada produk makanan ringan jenis umbi-umbian berdasarkan keberadaan gen pengkode toxin Hbl dan Nhe. Metode yang dilakukan dengan isolasi awal menggunakan media MYP Agar, uji MR, pengecatan gram, endospora, dan analisis hasil PCR gen toxin Hbl dan Nhe. Hasil pada penelitian ini menunjukkan sampel keripik kentang kemasan tercemar *Bacillus cereus* berdasarkan amplifikasi gen nheA, nheB, nheC pengkode toksin Nhe dan gen hblA, hblD, hblC pengkode gen toksin Hbl sedangkan terduga *Bacillus subtilis* tidak terdapat gen nheB.

Kata kunci: *Bacillus* sp., Gen toksin, Hemolysin BL Hbl, Makanan ringan, Non-hemolitik Nhe

ABSTRACT

Foodborne diseases, or illnesses caused by the consumption of contaminated food, can result from various microorganisms. One such microorganism is *Bacillus cereus*, a Gram-positive and facultatively anaerobic bacterium that can contaminate food and other raw materials from the environment. *Bacillus* species are able to survive extreme conditions due to the presence of spores, particularly in dried or powdered food products. Cases of *Bacillus cereus* contamination, which lead to foodborne illnesses, have been found in potato products. When ingested, *Bacillus cereus* can cause gastrointestinal symptoms such as abdominal pain and non-bloody diarrhea, occurring 4 to 16 hours after consumption. These symptoms are caused by the production of diarrheal toxins, including hemolysin BL (Hbl), non-hemolytic enterotoxin (Nhe), and cytotoxin CytK in the human intestine. This study aims to identify *Bacillus* species in snack products made from tubers based on the presence of

Hbl and Nhe toxin-encoding genes. The methods involved initial isolation using MYP Agar, MR testing, Gram staining, endospore detection, and PCR analysis for Hbl and Nhe toxin genes. The results of this study showed that packaged potato chips were contaminated with Bacillus cereus, as indicated by the amplification of the nheA, nheB, and nheC genes encoding Nhe toxins, and the hblA, hblD, and hblC genes encoding Hbl toxins, while suspected Bacillus subtilis did not possess the nheB gene.

Keywords: *Bacillus sp., Toxin genes, Hemolysin BL (Hbl), Snack foods, Non-hemolytic (Nhe)*

PENDAHULUAN

Kontaminasi bakteri terutama oleh kelompok *Bacillus* sp. menjadi kompleks dan sulit dihindari sehingga pentingnya untuk memperhatikan keamanan pangan. Data *foodborne disease* di Indonesia belum sepenuhnya lengkap untuk memperbaiki higienitas agar terhindar dari kontaminasi. Salah satu makanan yang menjadi pola konsumsi masyarakat Indonesia dan dunia karena gaya hidup sesuatu yang seringkali ingin melakukan segala dengan mudah dan cepat serta serba instan terutama dalam urusan makanan salah satunya camilan. Makanan ringan yang biasa disebut sebagai *camilan* berasal dari kata “camil” yang berarti makanan yang dimakan diantara dua waktu makan, berdasarkan Kamus Besar Bahasa Indonesia (KBBI). Konsumsi makanan ringan atau *snack* mengalami peningkatan terutama di masa pandemi COVID-19. Menurut salah satu perusahaan berbasis makanan ringan asal Amerika Serikat, Mondelez International’s State of Snacking melaporkan pada tahun 2020 sebanyak 88% responden termasuk masyarakat Indonesia mengalami peningkatan frekuensi konsumsi snack maupun dalam hal menjaga pola konsumsinya. Selain itu, Snapcart Online Survey di bulan Maret 2021 sebanyak 5.619 responden memberikan laporan bahwa 66% mengonsumsi traditional snack yang termasuk berbahan dasar umbi-umbian. 56% responden memilih membeli snack bermerk sedangkan 22% responden memilih untuk membeli snack tanpa merk.

Kebiasaan konsumsi makanan tanpa memperhatikan kebersihan dan kemanannya dapat menimbulkan penyakit. *Foodborne disease* atau penyakit yang disebabkan karena konsumsi makanan dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme. Hal ini dapat terjadi ketika patogen pada makanan tertelan dan sel nya bertambah banyak pada manusia sebagai inang atau patogen memperbanyak sel nya dalam produk makanan dan menghasilkan toksin yang dikonsumsi oleh manusia (Bintsis, 2017). *Foodborne disease* mempengaruhi sebagian besar penduduk di dunia dan penanganannya perlu diperhatikan sehingga keamanan pangan tidak hanya dilihat sebagai makanan “yang penting bisa dimakan” (Jovanovic et al., 2021).

Pada tahun 2015 di Eropa kasus wabah penyakit yang diakibatkan oleh bakteri paling banyak terjadi disebabkan oleh *Salmonella* spp. Dan *Campylobacter* spp. (EFSA, 2016). Selain kedua bakteri tersebut terdapat pula bakteri penyebab sakit atau patogen lainnya yang perlu diwaspadai yaitu *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus cereus* yang dapat membentuk spora dan resisten terhadap suhu tinggi seperti; *Staphylococcus aureus* dan, *C. botulinum* dengan memproduksi toksin yang resisten terhadap suhu tinggi (*heat-resistant toxins*) (Bintsis, 2017) (Moi et al., 2022).

Bacillus cereus sebagai bakteri gram positif dan fakultatif anaerob yang dapat mencemari dari lingkungan mampu melakukan pemulihan dari makanan dan bahan pangan yang lain. Beberapa strain *B. cereus* dapat bertambah banyak pada suhu 8 °C dan bawahnya hingga konsentrasi yang dapat

membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu menimbulkan bahaya terhadap konsumsi makanan dingin yang diproses secara minimal (Webb et al., 2019). *Bacillus cereus* juga hidup di tanah dan di perairan yang mengkontaminasi makanan sehingga menyebabkan sakit pada bagian gastrointestinal. *B. cereus* dapat menghasilkan toksin emetik yang ditandai dengan mual dan muntah setengah jam setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi (Dietrich et al., 2021) (Stenfors Arnesen et al., 2008). *B. cereus* termasuk bakteri tanah terutama pada padi dan dapat mencemari bahan pangan lain seperti; susu dan produknya, daging mentah, nasi, sayur-sayuran segar, bahkan ditemukan kasus kontaminasi *B. cereus* pada makanan bayi (Becker et al., 1994) (Tewari & Abdullah, 2015). *Bacillus* sp. Tetap dapat hidup di lingkungan makanan yang sudah mengalami berbagai proses seperti pemanasan dan pengeringan di mana secara umum menjadikan lingkungan yang membuat bakteri tidak dapat tumbuh. *B. cytotoxicus* ditemukan dan diisolasi dari produk kentang kering (Heini et al., 2018). Hal yang membuat *Bacillus* sp. Dapat bertahan di kondisi ekstrem adalah keberadaan spora terutama saat berada di bahan pangan yang sudah dikeringkan atau dibuat dalam bentuk bubuk. Kasus kontaminasi kelompok *B. cereus* yang mendatangkan *foodborne illness* ditemukan dalam produk kentang (Doan & Davidson, 2000; Heini et al., 2018) Pada penelitian Heini et al., (2018) menunjukkan bahwa cemaran *B. cereus* s.l. sebanyak 78% dari total 13 makanan bayi bubuk dan 92% dari 13 *mashed potato powder* dengan total 28 strain *B. cereus* diisolasi. Choma et al., (2000) menemukan *B. cereus* pada 60% bubur kentang atau *potato puree* yang telah dipasteurisasi setelah melalui masa inkubasi 5 hingga 12 hari dan 80% sampel yang sama diinkubasi 20 hari pada suhu 10 °C. Selain itu, *B. cereus* juga ditemukan di bubur (*pureed*) brokoli, wortel, zucchini, dan kacang polong. Makanan yang terkontaminasi *B. cereus* dan terkonsumsi dapat memberikan dampak terhadap sakit pencernaan berupa sakit perut dan diare tidak berdarah yang terjadi 4 - 16 jam setelah konsumsi. Gejala-gejala tersebut disebabkan oleh produksi *diarrheal toxin hemolysin* BL, Hbl, enterotoksin nonhemolitik Nhe dan sitotoksin CytK pada usus manusia (Ehling-Schulz et al., 2006; Fagerlund et al., 2004; Vidic et al., 2020).

Berdasarkan hal diatas, penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi *Bacillus* sp. Berdasarkan keberadaan gen toxin Hbl dan Nhe yang terdapat dalam makanan ringan atau camilan berbahan dasar umbi yang tersebar di Kota Yogyakarta.

METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel

Sampel sejumlah 11 makanan ringan dengan 6 diantaranya berbasis umbi yang dijual secara curah maupun kemasan. Masing-masing sampel sebanyak 10 gr dimasukkan dalam 90 mL air pepton 1% dan disimpan pada *rotary shaker* selama 24 jam dengan suhu 37°C atau disimpan *over night*.

Deteksi *Bacillus* sp.

Tahap isolasi *Bacillus* sp. menggunakan air pepton 0,1% sebanyak 9 ml dan 9,9 ml serta 1 ml dan 0,1 ml sampel, di homogenkan. Sebanyak 0,1 ml diinokulasikan pada permukaan media MYP (*Mannitol Egg Yolk Polymixin Agar*) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, UK) dengan teknik *spread plate*, diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Koloni terduga yang muncul akan dilakukan seleksi dan disimpan dalam media BHI Agar (*Brain Heart Infusion*) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, UK) untuk tahap uji selanjutnya.

Seleksi dan Identifikasi *Bacillus* sp.

Uji MR (Methyl-red)

Uji MR dilakukan dengan penambahan *methyl red indicator* dan diinkubasi pada suhu 37 °C dalam waktu 48 - 72 jam. Perubahan warna pada media menjadi merah mengindikasikan uji MR positif dan warna tetap kuning menunjukkan reaksi negatif

Uji Motilitas

Media NA (Natrium Agar) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, UK) semi solid dengan melakukan inokulasi isolat terduga, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pengecatan Gram

Pewarnaan gram menggunakan pewarna kristal violet untuk pewarnaan awal. Dilanjutkan dengan penggunaan iodine untuk membentuk kompleks kristal violet-iodine guna mencegah penghilangan pewarna dengan mudah. Selanjutnya, penghilang warna berupa pelarut etanol dan aseton.

Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora menggunakan pewarna primer hijau malachite atau *green malachite* dengan meletakkan di atas gelas benda dan dipanaskan untuk memicu endospora. Pewarnaan sel vegetatif dengan safranin menjadi merah muda sehingga hasilnya adalah endospora yang tampak hijau dan sel vegetatif yang tampak merah muda.

Deteksi Gen *Hbl* dan *Nhe*

Deteksi gen toxin *Hbl* dan *Nhe* diawali dengan melakukan isolasi DNA menggunakan *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)*. Amplifikasi DNA menggunakan *primer* gen target berdasarkan rancangan Wehrle *et al.*, (2009) dengan tabel sebagai berikut:

Tabel 1. Susunan Primer Pengkode Gen Toxin *Hbl* dan *Nhe* pada *Bacillus sp.* Untuk Deteksi Molekuler

Toxin	Gen Target	Urutan Primer	Ukuran Basa (Bp)
Hbl	<i>hblA</i>	ATT AAT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T TGATCCTAA TAC TTC TTC TAAG ACG CIT	237
	<i>hblD</i>	AGG TCA ACA GGC AAC GAC TC CGA GAC TCC ACC AAC AAC AG	205
	<i>hblC</i>	CGA AAA TTA GGT GCGCAATC TAA TAT GCC TTG CGC AGT TG	411
Nhe	<i>nheA</i>	GAC GGG CAA ACA GTG AA TGC GAA CTT TTG ATG ATT CG	186
	<i>nheB</i>	CCG CTT CTG CAA AAT CAA AT TGC GCA GTT GTA ACT TGT CC	281
	<i>nheC</i>	ACA TCC TTT TGC AGC AGA AC CCA CCA GCA ATG ACC ATA TC	618

Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi; pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit; *denaturasi* pada suhu 94 °C selama 1 menit; *annealing* pada suhu 49 °C selama 1 menit dan 52 °C selama 1 menit; *extension* pada suhu 72 °C selama 2 menit; *final extension* pada suhu 72 °C selama 10 menit; final pada suhu 4 °C selama 30 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi *Bacillus sp.*

Deteksi keberadaan *Bacillus* sp. Pada sampel makanan ringan dilakukan dengan teknik *spread plate* di atas medium MYP Agar di mana terbentuk koloni dengan karakteristik tertentu. Terdapat 2 sampel makana ringan curah dan kemasan berbasis kentang, masing-masingnya yang terduga sebagai kelompok *Bacillus cereus* dengan jenis koloni berwarna merah muda, berbentuk bulat beraturan maupun tidak beraturan dan koloni dengan tipikal berwarna kuning bulat yang terduga sebagai *Bacillus subtilis*. Berdasarkan morfologi koloni yang didapat dari medium MYP Agar, koloni terduga *B. cereus* dan *B. subtilis* akan dilanjutkan dengan uji seleksi serta identifikasi berdasarkan sifat-sifat biokimiwinya.

Tabel 2. Deteksi *Bacillus* sp. Pada medium MYP Agar

No.	Sampel	Kode Sampel	Identifikasi
1.	Keripik Kentang (curah)	S9KKL	Terduga <i>Bacillus subtilis</i>
		S9KKK	Terduga <i>Bacillus subtilis</i>
		S9KP	Terduga <i>Bacillus cereus</i>
2.	Keripik Kentang (Kemasan)	S11KP	Terduga <i>Bacillus cereus</i>

MYP (*Mannitol Egg Yolk Polymyxin*) merupakan medium selektif yang bertujuan untuk mengisolasi *Bacillus cereus*. Pada medium MYP terdapat inhibitor yang berupa polimiksin dan dua indikator lainnya, manitol, *phenol red*, dan *egg yolk* atau kuning telur steril yang digunakan. Sehingga mikroorganisme lain yang tidak diinginkan tidak tumbuh. Kandungan nitrogen, vitamin dan sumber karbon didapatkan dari Ekstrak daging dan pepton dalam MYP. D-Manitol sebagai sumber karbohidrat dan fermentasinya dideteksi oleh pH indikator *phenol red*. Bakteri yang dapat melakukan fermentasi manitol akan menyebabkan lingkungan menjadi asam sehingga koloni berwarna kuning. Sedangkan, *Bacillus cereus* negatif manitol akan berwarna merah muda dan tipikal koloni yang membentuk seperti kawah (Harper et al., 2011). Emulsi *Egg yolk* dalam MYP menyediakan leticin di mana *B. cereus* memproduksi leticinase yang akan menghidrolisis leticin dari *egg yolk* sehingga membentuk presipitasi disekeliling koloni (*halo*). Sedangkan koloni *Bacillus subtilis* berwarna kuning karena dapat memfermentasi mannitol (Peng et al., 2001). Medium MYP sendiri tidak memiliki tambahan nutrisi untuk masa perbaikan sel ataupun pengkayaan sel dari *Bacillus cereus* (Harper et al., 2011; Montville et al., 2005).

Seleksi dan Identifikasi *Bacillus* sp.

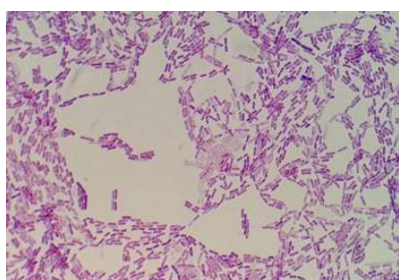
Seleksi *Bacillus* sp. Dari sampel dilakukan dengan uji pengecatan gram, uji MR, dan uji pengecatan endospora. Keempat kode sampel yang dilakukan uji MR memberikan hasil negatif dengan tidak adanya perubahan pada media atau warna tetap kuning. Hasil uji pengecatan gram seperti pada Gambar 1. menunjukkan bahwa koloni yang didapat memiliki warna ungu violet dan berbentuk batang atau *bacil*. Sedangkan pada pengecatan endospora keempat kode sampel memiliki endospora yang terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Pengecatan Endospora Keempat

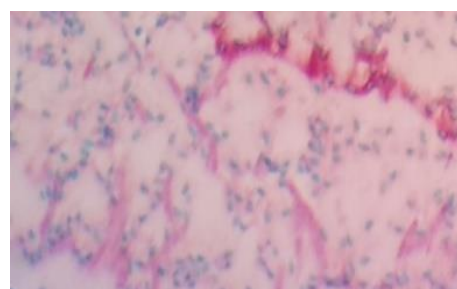
No.	Asal Sampel	Kode sampel	Uji Biokimia		Cat endospora	Identifikasi
			MR	Motilitas		

1.	Keripik Kentang (kemasan)	S.9 KKL	-	Motil	Memiliki endospora	Terduga <i>Bacillus subtilis</i>
		S.9 KKK	-	Motil	Memiliki endospora	Terduga <i>Bacillus subtilis</i>
		S.9 KP	-	Motil	Memiliki endospora	Terduga <i>Bacillus cereus</i>
2.	Keripik kentang keju asin	S.11 KP	-	Motil	Memiliki endospora	Terduga <i>Bacillus cereus</i>

Hasil seleksi menunjukkan dugaan antara *Bacillus cereus* atau *Bacillus subtilis*. *B. cereus* memiliki bentuk batang dan motil serta mampu membentuk spora seperti pada tabel 3. *B. cereus* adalah bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu violet dan warna hijau menunjukkan adanya produksi endospora setelah dilakukan pengecatan dengan *malachite green*. Ukuran sel *B. cereus* Sekitar 0,5 x 1,2 - 2,5 x 10 µm dalam diameter. Spora *B. cereus* memiliki sifat hidrofobik di alam dengan banyak appendiks dan/atau pili serta merupakan faktor virulensi yang memungkinkan sel teradsorpsi dengan kuat pada berbagai jenis permukaan sehingga sulit dihilangkan saat desinfeksi (Dierick et al., 2005).



Gambar 1. Hasil uji pengecatan gram terduga *Bacillus* sp.

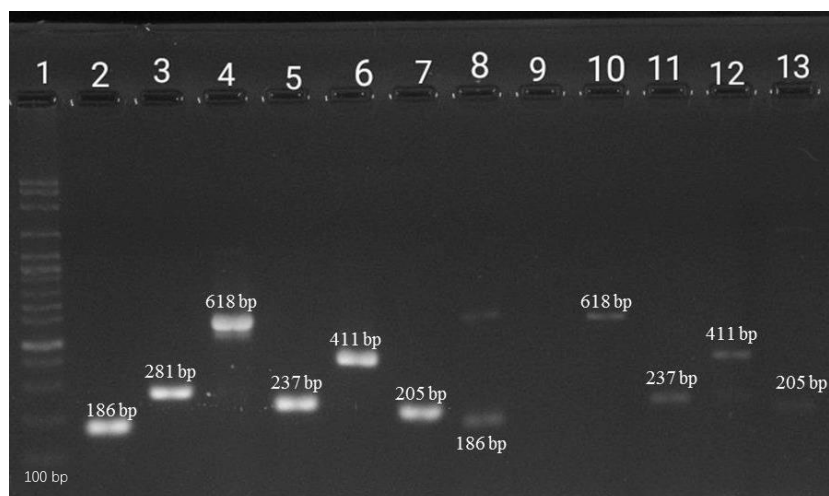


Gambar 2. Hasil uji pengecatan endospora terduga *Bacillus* sp.

B. Subtilis juga merupakan bakteri gram positif, aerobik dengan bentuk batang yang panjangnya 2 - 6 µm dan diameternya kurang dari 1 µm. Pada kondisi kekurangan nutrisi sel dapat mengalami diferensiasi kompleks yang mengarah pada pembentukan endospora yang dilepaskan melalui lisis sel induk pembungkusnya. Fase vegetatif sel memiliki sifat motil atau sel dapat membentuk biofilm yang mengandung spora (Errington & Aart, 2020).

Deteksi Gen Toxin *Hbl* dan *NHe*

Pada Gambar 3. merupakan Hasil amplifikasi gen toxin *Hbl* dan *Nhe* pada dengan kode sampel S9KP yang terduga sebagai *B. cereus* dan kode sampel S9KKL terduga sebagai *B. subtilis*. Kedua isolat didapatkan dari satu sampel yang sama yaitu keripik kentang kemasan dengan karakter pertumbuhan koloni lebih baik dari kedua isolat terduga lainnya. Gambar 3. menunjukkan adanya ampikon pada terduga *Bacillus cereus* maupun *Bacillus subtilis*. Nomor 1 merupakan marker 100 bp dan nomor 2 hingga 7 merupakan isolat *B. cereus* sedangkan nomor 8 hingga 13 merupakan isolat *B. subtilis*.



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen toxin Hbl dan Nhe terduga *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*

Pada nomor 2 hingga 7 dengan kode sampel S9KP merupakan *B.cereus* karena menunjukkan bahwa *B. cereus* memiliki gen hemolisin (Hbl) dan nonhemolisin (Nhe). *B. cereus* memproduksi toxin emetik dan beberapa enterotoksin yang termasuk non-hemolitik enterotoksin (Nhe), hemolisin BL (Hbl), sitolisin K (CytK), hemolisin II (HlyII), enterotoksin FM (EntFM) dan enterotoksin T (bc-D-ENT) (Ngamwongsatit *et al.*, 2008). Enterotoxin kompleks hemolisin BL (Hbl) dan Nonhemolitik enterotoksin (Nhe) merupakan penyebab keracunan dengan gejala yaitu diare dan muntah karena spora maupun selvegetatif *B. cereus* ketika tertelan dan masuk dalam saluran pencernaan terutama usus kecil. *Bacillus cereus* sendiri merupakan bakteri yang dapat menyebabkan sakit yang diakibatkan oleh makanan (Beecher *et al.*, 1995; Jay *et al.*, 2008; Lund & Granum, 1996).

Hasil identifikasi terduga *B. subtilis* memiliki gen yang mengkode enterotoksin Hbl dan Nhe dengan hasil amplikon yang tipis namun, pada nomor 9 tidak adanya amplikon yang menunjukkan bahwa ekspresi gen *NheB* pada terduga *B. subtilis* tidak muncul yang dapat dilihat pada nomor 8 hingga 13 dengan kode sampel S9KKL. Pada hasil tersebut terlihat sampel keripik kentang kemasan tercemar bakteri *B. cereus* dan terduga *B. subtilis*. Gen toksin Nhe bertindak sebagai *pore-forming toxin* yang terbentuk dengan pengikatan secara spesifik antara *NheA*, *NheB* dan *NheC*. Keberadaan *NheC* wajib pada langkah awal pembentukan toksin. *NheA* wajib ada pada langkah terakhir dan memicu toksisitas melalui mekanisme yang belum diketahui. *NheB* mengikat membran sel secara independen dari komponen lainnya. Namun, kompleks toksin yang sepenuhnya aktif terbentuk hanya ketika *NheB* diaplikasikan bersama dengan *NheC* atau setelah priming sel dengan *NheC* (Heilkenbrinker *et al.*, 2013).

Pembahasan

Kasus *foodborne disease* yang disebabkan oleh *Bacillus* sp. Telah dilaporkan dalam beberapa kasus terutama makanan yang terkontaminasi oleh *B. cereus* karena memiliki toksin hemolitik dan nonhemolitik (Ngamwongsatit *et al.*, 2008). Pada hasil penelitian yang sudah dipaparkan makanan ringan berupa keripik kentang kemasan menjadi satu sampel yang terindikasi terdapat kontaminasi baik dari *B. cereus* maupun *B. subtilis*. Hal tersebut dapat dilihat dari tumbuhnya isolat pada media MYP Agar. Langkah selanjutnya mengarah pada pengujian secara molekuler untuk melakukan identifikasi terduga *B. cereus* dan *B. subtilis* berdasarkan adanya gen pengkode toksin Nhe dan Hbl. Pada Gambar 3 terduga *B. cereus* terkonfirmasi memiliki gen pengkode toksin Nhe yang ditunjukkan pada nomor 2 hingga 4 yaitu, *nheA*, *nheB*, *nheC* secara berurutan dan gen pengkode toksin Hbl pada

nomor 5 hingga 7 yaitu, *hblA*, *hblC*, *hblD* secara berurutan. Toksin Hbl dan Nhe merupakan faktor virulensi pada *B. cereus* yang dapat menyebabkan sakit diare (Tewari & Abdullah, 2015). Hemolisin BL (Hbl) merupakan tiga komponen toksin yang terdiri dari dua litik protein, L2 dan L1, serta komponen pengikat B yang dikode dengan *hblC*, *hblD*, dan *hblA*. Ketiga komponen tersebut diperlukan dalam aktivitas toksin hemolisin BL (Zeighami et al., 2020).

Kontaminasi *B. cereus* terjadi di beberapa matriks pangan. Pada penelitian Zeighami *et al.*, (2020) dari 200 sampel daging dari Iran sebanyak 89,6% diantaranya terdapat setidaknya satu atau lebih gen enterotoksin dari *B. cereus*: 5 isolat dari daging domba, 9 isolat dari daging sapi dan 12 isolat dari sampel daging yang telah dimasak. Profil enterotoksin didapatkan paling tidak satu gen Hbl kompleks (*hblDAC*) pada 22 isolat dan satu gen Nhe kompleks (*nheABC*) terdeteksi pada 23 isolat *B. cereus*. Gen enterotoksin yang paling umum adalah *nheA* (58,6%), diikuti oleh *hblD* (51,7%), *nheB* dan *nheC* (48,3%). Kombinasi gen enterotoksin yang sering terjadi diantara sampel adalah *nheA* + *nheB* + *nheC* + *hblA* + *hblD* (11,5%). Penelitian sebelumnya yang terjadi di Iran sebanyak 15,6% dari sampel daging ayam mentah positif *B. cereus* (Tahmasebi et al., 2014). Kasus lainnya terjadi di India di mana daging mentah dan produk daging terkontaminasi *B. cereus* telah dilaporkan sebanyak 30,9% positif dari kultur yang berasal dari sampel tersebut (Tewari & Abdullah, 2015).

Hasil penelitian ini tidak memeperlihatkan mengenai distribusi maupun kompleksitas gen Nhe dan Hbl pada sampel yang positif namun, dapat dikonfirmasi bila sampel keripik kentang kemasan terkontaminasi terduga *B. cereus* berdasarkan adanya gen *NheA*, *NheB*, *NheC* dan gen *HblA*, *HblC*, *HblD* karena pita DNA teramplifikasi sesuai dengan panjang dan urutan primer dari gen pengkode toksin tersebut. Seperti pada penelitian Zeighami *et al.*, (2020) dari sampel yang berbeda menunjukkan adanya distribusi gen Nhe dan Hbl juga adanya kompleks dari kedua gen pengkode toksin tersebut sebagai faktor virulensi *B. cereus*.

Pada tanaman kentang, mikroorganisme yang terdapat pada kentang pun bervariasi mulai dari masa pertumbuhan, masa panen, penanganan hingga proses dalam membuat makanan berbasis kentang sehingga *Bacillus cereus* yang hidup di banyak tempat di lingkungan dapat ada pada kentang mentah yang ditemukan juga pada *potato puree* terbuat dari kentang utuh (King et al., 2007). Selama pembuatan kentang kering, spora mikroorganisme yang tahan terhadap panas dan pengeringan dapat bertahan hidup selama proses dan mencemari produk akhir di mana *B. cereus* sendiri memiliki spora yang tahan terhadap lingkungan kering maupun suhu panas (Doan & Davidson, 2000) terbukti pada proses pengecatan endospora (Gambar 2.) yang perlu dilakukan pemanasan untuk memicu endosporan tersebut muncul. Produksi toksin emetik telah terbukti lebih besar pada bubur kentang atau *potato puree* dan pasta daripada pada nasi yang telah dimasak, meskipun jumlah akhir organisme serupa pada ketiga makanan (Rajkovic et al., 2006). Konsentrasi toksin sebesar $4,08 \times 10^3$ ng g⁻¹ diukur pada kentang yang diinkubasi pada suhu 28 °C. Pertumbuhan dan produksi toksin juga terjadi ketika makanan diinkubasi pada suhu 12 °C dan 22 °C (King et al., 2007).

Pada penelitian Zhang *et al.*, (2017) 22,5% isolat dari total 587 sampel makanan bayi kemasan terdeteksi strain *B. cereus* memiliki sembilan gen enterotoksin. 97,5% isolat mengandung sedikitnya satu gen enterotoksin. Gen *nheABC* terdapat pada 90% isolat, sesuai dengan laporan bahwa sebagian besar strain *B. cereus* yang diisolasi dari berbagai sampel sumber makanan mengandung gen Nhe. Frekuensi terdapatnya gen *hblCDA* pada isolat *B. cereus* adalah 52,5%. Namun, tingkat deteksi pada strain yang berasal dari susu formula bayi dan tepung beras masing-masing adalah 45,5% dan 85,7%, menunjukkan perbedaan besar antara kedua jenis makanan bayi tersebut.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian di berbagai sumber makanan terutama berbahan dasar kentang dan sudah mengalami berbagai proses pemasakan dan bahkan penyimpanan untuk menghindari kontaminan. Namun, *B. cereus* yang memiliki endospora tahan pada kondisi ekstrem dan dapat meregulasi toksin Nhe dan Hbl sebagai faktor virulensi masih dapat ditemukan walaupun *B. cereus* tidak menjadi sorotan utama dalam hal wabah keracunan makanan seperti kasus Salmonellosis. Selain itu, pada sampel keripik kentang kemasan dengan kode S9KKL terduga *B. subtilis* di mana gen Nhe dan Hbl sama-sama teramplifikasi kecuali pada *nheB* yang kemungkinan tidak dapat meregulasi toksin Nhe dan kasus keracunan makanan karena strain *Bacillus* sp. Yaitu *B. cereus* lebih banyak terjadi dibandingkan *B. subtilis*.

KESIMPULAN

Hasil penelitian terhadap identifikasi *Bacillus* sp. Pada makanan ringan berbasis Umbi-umbian telah didapatkan satu sampel keripik kentang kemasan yang terduga terdapat *B. cereus* dan terkonfirmasi melalui analisis molekuler dengan adanya amplifikasi gen pengkode toksin Nhe (*nheA*, *nheB*, *nheC*) dan Hbl (*hblA*, *hblC*, *hblD*) sedangkan *B. subtilis* yang memiliki karakteristik koloni terduga di MYP Agar setelah melalui analisis molekuler gen *nheB* tidak teramplifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., & Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1), 1–15.
- Beecher, D. J., Pulido, J. S., Barney, N. P., & Wong, A. C. (1995). Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infection and Immunity*, 63(2), 632–639.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., & Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4277–4279.
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E., & Granum, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98.
- Doan, C. H., & Davidson, P. M. (2000). Microbiology of potatoes and potato products: a review. *Journal of Food Protection*, 63(5), 668–683.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.-H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., & Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260(2), 232–240.
- Errington, J., & Aart, L. T. van der. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425–427.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S. P., & Granum, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150(8), 2689–2697.
- Harper, N. M., Getty, K. J. K., Schmidt, K. A., Nutsch, A. L., & Linton, R. H. (2011). Comparing the mannitol-egg yolk-polymyxin agar plating method with the three-tube most-probable-number method for enumeration of *Bacillus cereus* spores in raw and high-temperature, short-time pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 74(3), 461–464.
- Heilkenbrinker, U., Dietrich, R., Didier, A., Zhu, K., Lindbäck, T., Granum, P. E., & Märklbauer, E. (2013). Complex formation between NheB and NheC is necessary to induce cytotoxic activity by the three-component *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *PLoS One*, 8(4), e63104.
- Heini, N., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., & Jöhler, S. (2018). Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 59–64.

- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761.
- King, N. J., Whyte, R., & Hudson, J. A. (2007). Presence and significance of *Bacillus cereus* in dehydrated potato products. *Journal of Food Protection*, 70(2), 514–520.
- Lund, T., & Granum, P. E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2–3), 151–156.
- Moi, I. M., Ibrahim, Z., Abubakar, B. M., Katagum, Y. M., Abdullahi, A., Yiga, G. A., Abdullahi, B., Mustapha, I., Ali, J., & Mahmud, Z. (2022). *Properties of Foodborne Pathogens and Their Diseases*. IntechOpen.
- Montville, T. J., Dengrove, R., De Siano, T., Bonnet, M., & Schaffner, D. W. (2005). Thermal resistance of spores from virulent strains of *Bacillus anthracis* and potential surrogates. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2362–2366.
- Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., & Panbangred, W. (2008). Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 352–356.
- Peng, H., Ford, V., Frampton, E. W., Restaino, L., Shelef, L. A., & Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiology*, 18(3), 231–238.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.-A., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M., & Debevere, J. (2006). Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of Food Protection*, 69(4), 847–852.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606.
- Tahmasebi, H., Talebi, R., & Zarif, B. R. (2014). Isolated of *Bacillus cereus* in chicken meat and investigation β -lactamase antibiotic-resistant in *Bacillus cereus* from chicken meat. *Advances in Life Sciences*, 4(4), 200–206.
- Tewari, A., & Abdullah, S. (2015). *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2500–2511.
- Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., & Heyndrickx, M. (2020). Food sensing: Detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products. *Biosensors*, 10(3), 15.
- Webb, M. D., Barker, G. C., Goodburn, K. E., & Peck, M. W. (2019). Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 94–105.
- Zeighami, H., Nejad-Dost, G., Parsadanians, A., Daneshamouz, S., & Haggi, F. (2020). Frequency of hemolysin BL and non-hemolytic enterotoxin complex genes of *Bacillus cereus* in raw and cooked meat samples in Zanjan, Iran. *Toxicology Reports*, 7, 89–92.



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).