

Inaktivasi Bakteri Patogen Planktonik dan Biofilm oleh Sanitaiser Komersial

Inactivation of Planktonic and Biofilm of Pathogenic Bacteria by Commercial Sanitizers

Ratih Dewanti-Hariyadi^{1,2} dan Cynthia¹

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

² Southeast Asian Food and Agriculture Science and Technology Center,
Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor

Abstract. *Cleaning and sanitizing are important aspects in providing quality and safe foods. In the US, contaminated equipment is the third most important factor contributing to foodborne disease outbreaks. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of commercial sanitizers against planktonic cells and biofilms of pathogenic bacteria *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Commercial sanitizers used in this study were single sanitizers (quaternary ammonium, peroxy acetic acid, coconut fatty acid) and combined sanitizers (Oxyquart[®], Bioclean 520[®], Bioclean 540[®]) at the recommended application concentrations. Of the sanitizers tested on planktonic cells, peroxy acetic acid at 100 ppm as well as Oxyquart[®] and Bioclean 540[®] at concentrations of 0.010% are effective against *S. Typhimurium*; while Oxyquart[®] at a concentration of 0.005% is the most effective sanitizer against *S. aureus*. The study also shows that Oxyquart[®] is more effective against biofilms and capable of inactivating 3.94-5.02 log CFU/cm² of *S. Typhimurium* or *S. aureus* biofilm.*

Keywords: *commercial sanitizers, foodborne pathogen, biofilm, planktonic, combined sanitizers*

Abstrak. Pembersihan dan sanitasi peralatan adalah aspek penting dalam untuk menghasilkan pangan yang bermutu dan aman. Di Amerika Serikat, peralatan yang kotor dan tidak saniter merupakan penyebab ketiga terpenting kejadian keracunan pangan. Pembersihan dan sanitasi peralatan pengolahan pangan dapat dilakukan dengan menggunakan cara fisik maupun dengan pembersih dan sanitaiser kimia yang diijinkan. Sanitaiser peralatan pangan umumnya diformulasikan dengan senyawa kimia yang efektif membunuh mikroorganisme dan tidak meninggalkan residu dalam jumlah yang membahayakan kesehatan manusia. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi efektivitas sanitaiser komersial untuk menginaktivasi bakteri planktonik dan biofilm patogen *Salmonella Typhimurium* dan *Staphylococcus aureus*. Sanitaiser komersial yang digunakan adalah sanitaiser tunggal (amonium kuarterner, asam peroksi asetat dan coconut fatty acid) serta sanitaiser kombinasi (Oxyquart[®], Bioclean 520[®], Bioclean 540[®]) pada konsentrasi yang direkomendasikan. Diantara sanitaiser yang diuji terhadap sel planktonik, asam peroksi asetat 100 ppm, Oxyquart[®] dan Bioclean 540[®] pada konsentrasi 0.015% adalah yang paling efektif mereduksi *S. Typhimurium*, sementara Oxyquart[®] pada konsentrasi 0.005% efektif mereduksi *S. aureus*. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa Oxyquart[®] paling efektif dalam mereduksi biofilm kedua bakteri patogen dan mampu mereduksi bakteri biofilm sebesar 3.94-5.02 log CFU/cm².

Kata kunci: sanitaiser komersial, patogen bawaan pangan, biofilm, planktonik, sanitaiser kombinasi

Aplikasi Praktis: Penelitian ini menguji kemampuan sanitaiser komersial dalam menginaktifkan bakteri patogen bawaan pangan *Salmonella Typhimurium* dan *Staphylococcus aureus* baik sebagai sel planktonik maupun biofilm pada permukaan stainless steel. Sanitaiser yang digunakan terdiri dari sanitaiser tunggal maupun kombinasi yang dihasilkan oleh produsen domestik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa satu sanitaiser tunggal dan dua sanitaiser kombinasi dapat menginaktifkan *S. Typhimurium* maupun *S. aureus*. Kedua sanitaiser kombinasi berpotensi digunakan untuk mereduksi densitas bakteri biofilm pada permukaan stainless steel.

PENDAHULUAN

Penyakit bawaan pangan (*foodborne disease*) terus menjadi masalah kesehatan di dunia (WHO 2007). *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

Korespondensi: rdewantih@yahoo.com

melaporkan penyakit bawaan pangan di Amerika Serikat selama 2009-2010 sebanyak 29,444 kasus dengan 23 orang meninggal dunia (CDC 2013). Di Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI) melaporkan 6,901 kasus orang sakit dan 11 kasus

orang meninggal dunia karena penyakit bawaan pangan di tahun 2011 (BPOM 2012).

Menurut US *Food and Drug Administration* (FDA) (2009), lima faktor utama penyebab kejadian penyakit bawaan pangan adalah pangan dari sumber yang tidak aman, higiene personal yang kurang, proses pemasakan yang tidak tepat, penyimpangan suhu penyimpanan pangan dan kontaminasi dari peralatan. Di Amerika Serikat, peralatan pangan yang terkontaminasi berkontribusi sebesar 16% atau berada pada peringkat ketiga setelah penyimpangan suhu penyimpanan pangan (36%) dan higiene pekerja yang kurang (19%).

Di industri pangan, pembersihan atau penghilangan kotoran dari permukaan alat selalu diikuti dengan sanitasi untuk membunuh mikroorganisme dengan sanitaisir. Sanitaisir untuk peralatan yang kontak dengan pangan harus memenuhi beberapa persyaratan, yaitu memiliki spektrum aktivitas yang luas (terhadap bakteri, kapang, jamur, virus dan parasit), mampu mereduksi mikroba 5 log dalam waktu 30 detik pada suhu 25°C, tidak toksik, kompatibel dengan bahan kimia lain, aktif baik sebelum maupun sesudah diencerkan dengan air sadah, ekonomis dan tidak merusak lingkungan. Efektivitas sanitaisir juga dipengaruhi oleh jumlah dan lokasi, ketahanan mikroorganisme, waktu kontak, faktor kimia dan fisik (pH, suhu, RH, kesadahan air), keberadaan senyawa organik (lemak, karbohidrat, protein) dan biofilm (Rutala *et al.* 2008).

Mikroorganisme yang menempel pada permukaan peralatan yang kontak dapat membentuk biofilm (Srey *et al.* 2013) dan dapat berpindah ke bahan pangan sehingga menimbulkan penyakit (Todd *et al.* 2007). Bakteri biofilm umumnya lebih resisten terhadap panas, kekeringan atau senyawa antimikroba jika dibandingkan dengan sel planktoniknya karena memiliki polimer ekstraseluler yang dapat mencegah atau mengurangi kontak dengan senyawa antimikroba (Srey *et al.* 2013).

Sanitaisir kimia yang digunakan oleh industri pangan meliputi senyawa klorin, senyawa iodin, senyawa amonium kuaterner, asam organik, asam peroksi atau gabungan asam peroksi dengan asam organik (Simoes *et al.* 2010). Sanitaisir tunggal di atas telah disetujui oleh US FDA sebagai sanitaisir untuk peralatan yang kontak dengan pangan (CFR 2011). Untuk meningkatkan efektivitas sanitasi, berbagai sanitaisir kombinasi telah diformulasikan. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi efektivitas sanitaisir komersial baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dalam menginaktivasi bakteri patogen dan biofilm pada peralatan pangan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas sanitaisir komersial baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dalam menginaktivasi bakteri planktonik dan biofilm *Salmonella* Typhimurium dan *Staphylococcus aureus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini

adalah *Salmonella* Typhimurium yang diisolasi dari udang dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kedua kultur diperoleh dari Laboratorium Patogen SEAFast CENTER IPB.

Sanitaisir komersial yang digunakan diperoleh dari PT Kevin Chemindo Anugerah, Jakarta, berupa sanitaisir tunggal (senyawa amonium kuaterner/quat, asam peroksi asetat/PAA, *coconut fatty acid/CFA*) dan sanitaisir kombinasi (Oxyquart®, Bioclean 520®, Bioclean 540®). Sanitaisir kombinasi mengandung 2 atau 3 komponen sanitaisir tunggal dengan atau tanpa penambahan senyawa pembersih asam. Bahan lainnya yang digunakan adalah pelat *stainless steel* (SS) tipe 304 dari CV Halilintar Mekanika, Bogor, swab yang dilapis kalsium-alginat (Sigma Aldrich), alkohol 70%, kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak imersi, larutan pengencer KH₂PO₄, CaCl₂, H₂SO₄ pekat, BaSO₄, Tween 80 (Merck), Naheksametafosfat (Sigma Aldrich) dan deterjen komersial.

Media yang digunakan adalah *Tryptone Soy Agar/TSA* (Oxoid), *Tryptone Soy Broth/TSB* (Oxoid), *Nutrient Broth/NB* (Oxoid), *Broth* (Oxoid), dan buffer penetralisasi *Letheen Broth* (Scharlau).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas untuk uji mikrobiologi, sentrifus (Hermle type Z 383K), spektrofotometer (Shimadzu 2450 UV-Vis), inkubator goyang (New Brunswick Scientific Excella E250), inkubator suhu 37°C dan 55°C (Fisher Isotemp 300 Series).

Metode Penelitian

Penelitian terdiri atas (1) evaluasi sanitaisir komersial dalam menginaktivasi sel planktonik *S. Typhimurium* dan *S. aureus* dan (2) aplikasi sanitaisir komersial terbaik untuk menginaktivasi sel biofilm bakteri patogen tersebut. Tahapan penelitian adalah sebagai berikut: konfirmasi kultur bakteri uji, persiapan inokulum, persiapan larutan stok sanitaisir, inaktivasi sel planktonik, persiapan pelat SS dan inaktivasi bakteri biofilm.

Konfirmasi Kultur Bakteri Uji.

Sebelum digunakan, kultur *S. Typhimurium* maupun *S. aureus* dalam bentuk kering beku disegarkan dalam TSB dan dikonfirmasi secara biokimiawi dengan metode BAM (FDA 2011).

Persiapan Inokulum

Kultur bakteri pada fase akhir log dipanen, disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk memisahkan massa sel dari medium pertumbuhan. Massa sel atau endapan diresuspensi dalam larutan pengencer sehingga diperoleh larutan dengan kekeruhan setara dengan larutan standar McFarland 0.5. Larutan standar McFarland 0.5 diasumsikan setara dengan populasi kultur 1-2x10⁸ CFU/mL (CLSI 2012). Kultur setara dengan larutan standar McFarland 0.5 siap diencerkan untuk digunakan sebagai inokulum.

Persiapan Larutan Stok Sanitaiser Komersial

Sanitaiser komersial berbentuk cair dan dibuat larutan stoknya pada konsentrasi 1% dengan akuades, kecuali untuk *coconut fatty acid* ditambahkan 1% Tween 80 (Preuss *et al.* 2005).

Inaktivasi Sel Planktonik *S. Typhimurium* dan *S. aureus* dengan Sanitaiser Komersial

Sebanyak 6 buah tabung reaksi disiapkan, 1 buah untuk kontrol positif dan 5 untuk sampel uji. Untuk sampel uji, ke dalam tabung dimasukkan medium NB, larutan stok sanitaiser komersial dan kultur bakteri secara berurutan sedangkan tabung kontrol diisi dengan medium NB dan kultur bakteri saja. Volume total campuran dua atau tiga bahan tersebut adalah 5 mL.

Jumlah awal kultur bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah sekitar 10^5 CFU/mL (CLSI 2012). Untuk memperoleh larutan sanitaiser komersial dengan konsentrasi yang diinginkan, sejumlah larutan stok sanitaiser dipipet secara aseptik ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi sejumlah medium NB. Konsentrasi sanitaiser komersial yang digunakan adalah 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 dan 0.025% atau 50-250 ppm untuk sanitaiser tunggal. Pemilihan kisaran konsentrasi di atas mengacu pada konsentrasi sanitaiser yang umumnya digunakan pada peralatan pangan, yaitu 200 ppm untuk quat, 150-200 ppm untuk PAA dan 70-1500 ppm untuk asam lemak (Gaulin *et al.* 2011).

Tabung reaksi dikocok dengan vortex dan diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu 37°C, 130 rpm selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengenceran berseri dan pemupukan pada TSA serta diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Untuk tabung kontrol positif, dilakukan pemupukan pada 0 dan 24 jam. Koloni yang terbentuk dihitung dan dilaporkan sebagai *colony forming unit* per mL (CFU/mL). Reduksi jumlah bakteri uji adalah selisih antara jumlah log CFU/mL kontrol dengan log CFU/mL perlakuan

Persiapan Pelat *Stainless Steel* (SS) untuk Pembentukan Biofilm

Pelat SS tipe 304 dipotong berukuran 1x1 cm², direndam dalam larutan deterjen komersial selama 1 jam, disikat, dibilas dengan akuades dan dicelupkan dalam alkohol 70%. Pelat SS kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 55°C sampai kering dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Marques *et al.* 2007).

Pembentukan Biofilm dan Uji Efektivitas Sanitaiser Komersial Terpilih Terhadap Biofilm (Dewanti and Wong 1995)

Biofilm dibuat dengan memasukkan 1 mL inokulum ke dalam Erlenmeyer berisi 100 mL medium TSB yang diencerkan 5 kali dan pelat SS sehingga jumlah awal bakteri sekitar 10^5 CFU/mL. Erlenmeyer kemudian diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada suhu kamar

(28-30°C), kecepatan 70 rpm selama 48 jam. Setelah inkubasi, pelat SS yang telah mengandung biofilm diambil secara aseptik, dibilas dengan larutan pengencer dan direndam dalam 10 mL larutan sanitaiser komersial selama 2 menit. Untuk pengujian ini, digunakan Oxy-quart® dan Bioclean 540® dengan konsentrasi 0.125, 0.25, 0.5 dan 1% sesuai rekomendasi produsen. Setelah kontak dengan sanitaiser, pelat SS dipaparkan pada 10 mL buffer penetralisasi *letheen broth* selama 2 menit dan dibilas dengan larutan pengencer. Sel biofilm pada pelat SS kemudian diseka 3 kali dengan swab kalsium alginat. Swab kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pengencer dan 1 mL Naheksametafosfat 0.1% dan dikocok selama 1 menit. Setelah itu, dilakukan pengenceran berseri dan pemupukan dengan metode tuang menggunakan medium TSA serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang terbentuk dihitung dan dilaporkan sebagai CFU/cm².

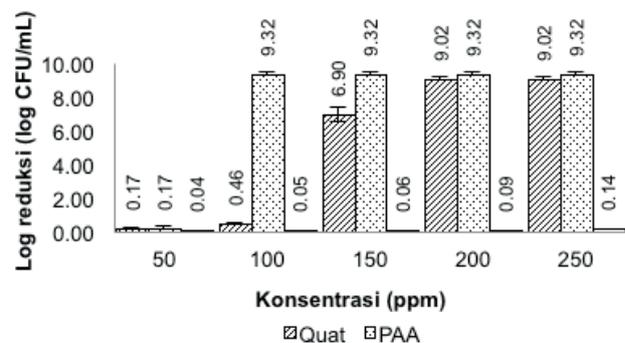
Analisis Data

Seluruh data hasil penelitian disajikan diolah secara statistik menggunakan program SAS (*Statistical Analysis Software*) versi 9.1 dengan uji *Analysis of Variance* dilanjutkan dengan uji berbeda nyata Duncan pada taraf signifikansi 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inaktivasi Sel Planktonik *S. Typhimurium* dan *S. aureus* oleh Sanitaiser Komersial

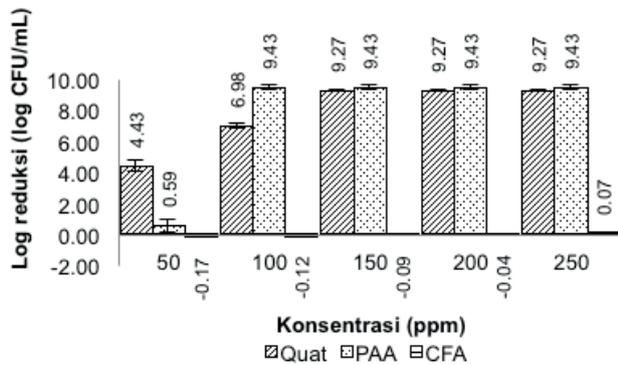
Gambar 1 menunjukkan bahwa inaktivasi *S. Typhimurium* oleh sanitaiser tunggal baru terlihat pada konsentrasi sanitaiser 100 ppm. Pada konsentrasi 100 ppm, PAA menunjukkan inaktivasi sebesar 9.32 log, sementara quat belum menunjukkan aktivitas inaktivasi. Pada kisaran konsentrasi yang diaplikasikan, quat mereduksi 0.17-9.02 log CFU/mL, PAA mereduksi 0.17-9.32 log CFU/mL sementara CFA tidak memiliki daya bunuh dan hanya mereduksi 0.04-0.14 log CFU/mL *S. Typhimurium*.



Gambar 1. Reduksi sel planktonik *S. Typhimurium* oleh sanitaiser komersial tunggal

Efektivitas pembunuhan *S. aureus* oleh sanitaiser tunggal telah nampak pada konsentrasi sanitaiser 50

ppm oleh quat, meskipun reduksi maksimal baru dicapai pada konsentrasi 150 ppm. Sementara itu, meski belum menunjukkan inaktivasi yang berarti pada konsentrasi 50 ppm, PAA mereduksi 9.43 log *S. aureus* pada konsentrasi 100 ppm. Pada konsentrasi yang diaplikasikan, reduksi *S. aureus* oleh quat berkisar antara 4.43-9.27 log CFU/mL, PAA mampu mereduksi 0.59-9.43 log CFU/mL dan tidak ada inaktivasi oleh CFA (Gambar 2).



Gambar 2. Reduksi sel planktonik *S. aureus* oleh sanitaisir komersial tunggal

Dari Gambar 1 dan 2 terlihat bahwa sanitaisir tunggal yang efektif mereduksi kedua patogen planktonik adalah PAA. PAA adalah senyawa yang dibentuk melalui reaksi penggabungan antara hidrogen peroksida dan asam asetat. Senyawa ini memiliki aroma asam yang kuat, pH rendah (2.8) dan kapasitas oksidasi yang kuat (FDA 1986). PAA membunuh mikroba dengan mengganggu permeabilitas dinding sel, mendenaturasi protein serta mengoksidasi ikatan sulfur pada protein, enzim dan metabolit lainnya. Keunggulan sanitaisir ini adalah tetap efektif meskipun terdapat senyawa organik lainnya, tidak terpengaruh oleh perubahan suhu dan memiliki spektrum penghambatan yang luas, sementara kelemahannya adalah bersifat korosif, tidak stabil bila diencerkan serta dapat mengiritasi kulit, mata dan membran mukosa (Rodgers *et al.* 2004).

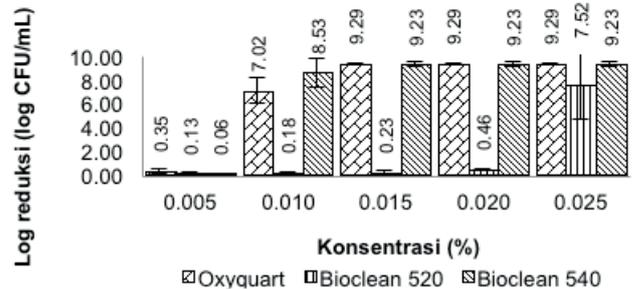
Quat atau senyawa amonium kuaterner adalah sanitaisir yang efektif menghambat bakteri Gram positif (Marriott 1999) dan oleh karenanya diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk mereduksi *S. Typhimurium* daripada *S. aureus*. Quat menginaktivasi mikroba dengan membentuk lapisan (*film*) yang menyebabkan kerusakan dinding sel sehingga terjadi kebocoran pada organ internal dan penghambatan enzim. Keunggulan quat adalah tidak berbau, tidak berwarna, stabil pada suhu tinggi, tidak bersifat korosif, tidak mengiritasi kulit, relatif stabil terhadap keberadaan senyawa organik dan daya penetrasinya baik sehingga dapat digunakan untuk permukaan peralatan yang berpori. Kelemahan quat adalah efektivitas berkurang pada pH kurang dari 6, tidak kompatibel dengan deterjen anionik dan tidak membunuh spora bakteri (Marriott 1999).

CFA pada konsentrasi yang digunakan ternyata tidak efektif mereduksi *S. Typhimurium* dan *S. aureus*. Pengujian CFA dilakukan karena bahan ini ditambahkan ke dalam sanitaisir kombinasi untuk mengurangi pengu-

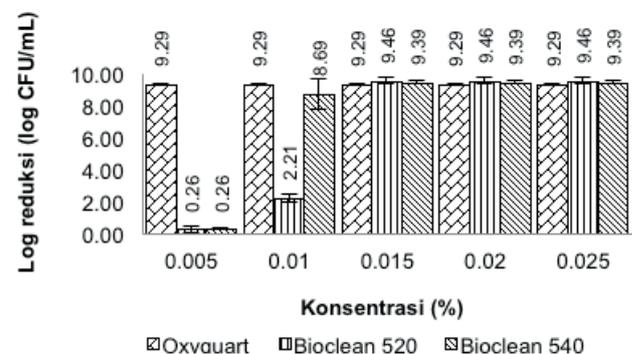
apan PAA. Asam lemak kelapa, yakni asam laurat serta monogliseridnya (monolaurin) telah dilaporkan dapat membunuh mikroorganisme tertentu. Widiyarti *et al.* (2009) melaporkan bahwa monolaurin memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Zhang *et al.* (2009) menunjukkan bahwa monolaurin mampu menghambat *S. aureus* dengan nilai MIC sebesar 12.5 µg/mL. Akan tetapi, CFA yang digunakan adalah ekstrak kasar yang tidak diketahui kandungan asam laurat dan atau monolaurinnya.

Sanitaisir kombinasi Oxyquart®, Bioclean 520® dan Bioclean 540® diuji efektivitasnya pada konsentrasi aplikasi lebih rendah daripada yang direkomendasikan yakni 1-2%. Pada konsentrasi yang diaplikasikan, Oxyquart® mampu mereduksi 0.35-9.29 log CFU/mL, Bioclean 520® mereduksi 0.13-7.52 log CFU/mL dan Bioclean 540® mereduksi 0.06-9.23 log CFU/mL *S. Typhimurium* (Gambar 3). Reduksi sebesar 9 log CFU/ml telah dicapai pada konsentrasi aplikasi 0.015% Oxyquart® dan Bioclean 540®.

Terhadap bakteri Gram positif *S. aureus*, Oxyquart® mereduksi 9.29 log CFU/mL, Bioclean 520® mereduksi 0.26-9.46 log CFU/mL dan Bioclean 540® mereduksi 0.26-9.39 log CFU/mL (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa Oxyquart® juga efektif untuk mereduksi *S. aureus*.



Gambar 3. Reduksi sel planktonik *S. Typhimurium* oleh sanitaisir komersial kombinasi



Gambar 4. Reduksi sel planktonik *S. aureus* oleh sanitaisir komersial kombinasi

Menurut Lehmann (1988), kombinasi sanitaisir dapat menghasilkan tiga pengaruh: sinergis, aditif dan antagonis. Pengaruh sinergis terjadi jika dengan kemampuan membunuh mikroba yang sama, konsentrasi sanitaisir kombinasi yang digunakan lebih rendah

dibandingkan konsentrasi sanitaisir secara individu, sedangkan pengaruh antagonis terjadi jika sanitaisir yang satu menghambat kerja sanitaisir lainnya.

Pengaruh sinergis diduga terjadi pada pada sanitaisir Oxyquart® yang mengandung PAA dan quat terhadap *S. aureus*. Sanitaisir ini menghambat 9 log *S. aureus* pada konsentrasi yang jauh lebih rendah (0.005%) dibanding senyawa penyusunnya yakni PAA pada konsentrasi 100 ppm (0.010%) dan quat pada 150 ppm (0.015%). Pengaruh sinergis ini tidak terjadi pada *S. Typhimurium*. Oxyquart yang didominasi oleh quat tidak efektif menghambat bakteri Gram negatif.

Analisis statistik data inaktivasi sel planktonik *S. Typhimurium* dan *S. aureus* oleh sanitaisir komersial disajikan pada Tabel 1. Tabel ini menunjukkan bahwa pengaruh PAA pada konsentrasi 100 ppm tidak berbeda nyata dengan quat 200 ppm dalam mereduksi *S. Typhimurium* dan penggunaan PAA pada konsentrasi 100 ppm tidak berbeda nyata dengan quat pada konsentrasi 150 ppm dalam mereduksi *S. aureus*. Dengan kata lain, PAA secara signifikan lebih efektif dibandingkan quat dalam mereduksi *S. Typhimurium* dan *S. aureus* karena konsentrasi yang dibutuhkan lebih rendah.

Quat dan Oxyquart® efektif mereduksi bakteri patogen Gram positif *S. aureus* sedangkan PAA dan Bio-clean 540® efektif mereduksi baik Gram positif *S. aureus* maupun Gram negatif *S. Typhimurium*. Kandungan quat dalam Oxyquart® lebih besar sehingga lebih efektif dalam mereduksi bakteri Gram positif, sebaliknya Oxyquart® tidak terlalu efektif mereduksi Gram negatif. Bioclean 540® mengandung komponen PAA dalam jumlah lebih besar sehingga efektif mereduksi bakteri Gram positif maupun negatif. Block (2001) menyatakan bahwa PAA memiliki spektrum aktivitas antibakteri yang luas sehingga efektif terhadap bakteri Gram positif dan negatif.

S. aureus lebih sensitif terhadap kelima sanitaisir komersial dibandingkan *S. Typhimurium*. Hal ini ditunjukkan dari nilai log reduksi *S. aureus* yang lebih besar dan konsentrasi sanitaisir komersial yang dibutuhkan untuk mereduksi *S. aureus* lebih rendah. *S. aureus* lebih peka terhadap sanitaisir karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang sebagian besar tersusun atas lapisan peptidoglikan dan asam teikoat sehingga mudah dilewati oleh komponen yang bersifat hidrofilik, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks karena terdapat membran luar yang melindungi lapisan peptidoglikan, yaitu lipopolisakarida (LPS). Perbedaan struktur dinding sel berpengaruh pada ketahanan mikroba terhadap perlakuan bahan antimikroba dan bagian penting dari dinding sel adalah lapisan peptidoglikan. Lapisan ini berfungsi untuk melindungi sel bakteri dari perubahan kondisi lingkungan dan faktor-faktor luar yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan akhirnya mengakibatkan kematian sel. Pada bakteri Gram positif, senyawa antimikroba lebih mudah masuk dan mencapai lapisan peptidoglikan, sedangkan pada bakteri Gram negatif, senyawa antimikroba harus melalui membran terluar yang mengandung banyak

Tabel 1. Analisis statistik reduksi *S. Typhimurium* dan *S. aureus* oleh berbagai sanitaisir

| Sanitaisir | Konsentrasi penggunaan (%v/v) | Reduksi bakteri (log CFU/mL) | |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | <i>S. Typhimurium</i> | <i>S. aureus</i> |
| Quat | 0.005 | 0.17 ± 0.01 ^d | 4.43 ± 0.33 ^d |
| | 0.01 | 0.46 ± 0.02 ^d | 6.98 ± 0.14 ^c |
| | 0.015 | 6.90 ± 0.40 ^c | 9.27 ± 0.01 ^a |
| | 0.02 | 9.02 ± 0.09 ^a | 9.27 ± 0.01 ^a |
| | 0.025 | 9.02 ± 0.09 ^a | 9.27 ± 0.01 ^a |
| PAA | 0.005 | 0.17 ± 0.08 ^d | 0.59 ± 0.37 ^f |
| | 0.01 | 9.32 ± 0.05 ^a | 9.43 ± 0.15 ^a |
| | 0.015 | 9.32 ± 0.05 ^a | 9.43 ± 0.15 ^a |
| | 0.02 | 9.32 ± 0.05 ^a | 9.43 ± 0.15 ^a |
| | 0.025 | 9.32 ± 0.05 ^a | 9.43 ± 0.15 ^a |
| CFA | 0.005 | 0.04 ± 0.02 ^d | -0.17 ± 0.16 ^g |
| | 0.010 | 0.05 ± 0.01 ^d | -0.12 ± 0.12 ^g |
| | 0.015 | 0.06 ± 0.00 ^d | -0.09 ± 0.10 ^g |
| | 0.020 | 0.09 ± 0.04 ^d | -0.04 ± 0.13 ^g |
| | 0.025 | 0.14 ± 0.01 ^d | 0.07 ± 0.10 ^g |
| Oxyquart® | 0.005 | 0.35 ± 0.19 ^d | 9.29 ± 0.01 ^a |
| | 0.01 | 7.02 ± 1.05 ^c | 9.29 ± 0.01 ^a |
| | 0.015 | 9.29 ± 0.03 ^a | 9.29 ± 0.01 ^a |
| | 0.02 | 9.29 ± 0.03 ^a | 9.29 ± 0.01 ^a |
| | 0.025 | 9.29 ± 0.03 ^a | 9.29 ± 0.01 ^a |
| Bioclean 520® | 0.005 | 0.13 ± 0.10 ^d | 0.26 ± 0.19 ^g |
| | 0.01 | 0.18 ± 0.08 ^d | 2.21 ± 0.21 ^e |
| | 0.015 | 0.23 ± 0.10 ^d | 9.46 ± 0.19 ^a |
| | 0.02 | 0.46 ± 0.04 ^d | 9.46 ± 0.19 ^a |
| | 0.025 | 7.52 ± 2.74 ^{bc} | 9.46 ± 0.19 ^a |
| Bioclean 540® | 0.005 | 0.06 ± 0.03 ^d | 0.26 ± 0.02 ^g |
| | 0.01 | 8.53 ± 1.17 ^{ab} | 8.69 ± 0.90 ^b |
| | 0.015 | 9.23 ± 0.18 ^a | 9.39 ± 0.09 ^a |
| | 0.02 | 9.23 ± 0.18 ^a | 9.39 ± 0.09 ^a |
| | 0.025 | 9.23 ± 0.18 ^a | 9.39 ± 0.09 ^a |

^aData yang diikuti huruf sama pada kolom sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 0.05

^aTanda negatif menunjukkan tidak terjadi reduksi jumlah bakteri uj

LPS. Oleh karena itu, bakteri Gram positif lebih mudah diinaktivasi dibandingkan bakteri Gram negatif.

Bioclean 520® mengandung komponen aktif quat, PAA dan pembersih asam. Tujuan penambahan pembersih asam pada sanitaisir kombinasi ini adalah untuk menjadikan sampel ini sebagai produk “2 in 1”, yang membersihkan sekaligus mensanitasi. Bioclean 520® kurang efektif dalam mereduksi *S. Typhimurium* dan *S. aureus*. Penambahan pembersih asam menyebabkan efektivitas quat berkurang sehingga efektivitas Bioclean 520® pun menjadi berkurang. Marriott (1999) menyatakan bahwa efektivitas quat turun pada pH kurang dari 6. Kombinasi senyawa sanitaisir ternyata bersifat antagonistik.

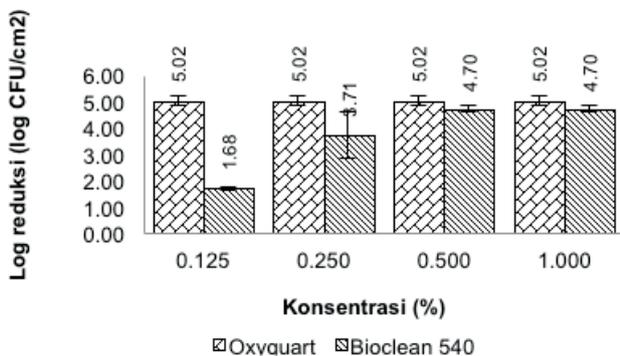
Dari keenam jenis sanitaisir komersial yang diuji, PAA 100 ppm efektif mereduksi *S. Typhimurium* dan *S. aureus* dengan nilai log reduksi masing-masing sebesar 9.32 dan 9.43 CFU/mL. Meskipun demikian, hasil analisis statistik pada Tabel 1 menunjukkan bahwa peng-

gunaan PAA 100 ppm tidak berbeda nyata dengan quat 200 ppm, Bioclean 520[®] 0.015% dan Bioclean 540[®] 0.015% dalam mereduksi *S. Typhimurium*. Hal di atas berlaku juga untuk reduksi *S. aureus* dimana hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penggunaan PAA 100 ppm tidak berbeda nyata dengan quat 150 ppm, Bioclean 520[®] 0.005% maupun Bioclean 540[®] 0.015% dalam mereduksi *S. aureus*.

Reduksi *S. Typhimurium* oleh sanitaisir kombinasi Oxyquart[®] 0.015% atau Bioclean 540[®] 0.005% atau 0.015% tidak berbeda nyata. Sementara itu Oxyquart[®] pada konsentrasi 0.05% dan Bioclean 540[®] pada konsentrasi 0.015% mereduksi *S. aureus* dalam jumlah yang sama. Dengan demikian, sanitaisir Oxyquart[®] sama efektifnya dengan Bioclean 540[®] dalam mereduksi *S. Typhimurium*, tetapi Oxyquart[®] lebih efektif dalam mereduksi *S. aureus* karena konsentrasi yang dibutuhkan lebih rendah.

Pengaruh Sanitaisir Komersial Terhadap Biofilm

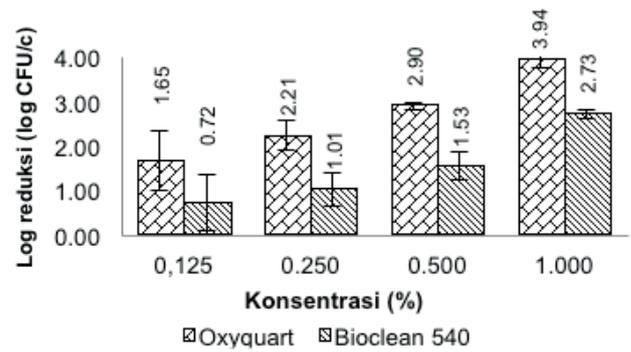
Pada Gambar 5, terlihat bahwa pada kisaran konsentrasi yang diaplikasikan, Oxyquart[®] mampu mereduksi 5.02 log CFU/cm² dan Bioclean 540[®] mereduksi 1.68-4.70 log CFU/cm² biofilm *S. Typhimurium*. Selain itu, Oxyquart[®] mereduksi 1.65-3.94 log CFU/cm² sementara Bioclean 540[®] mereduksi 0.72-2.73 log CFU/cm² biofilm *S. aureus* (Gambar 6). Karena sifat biofilm yang lebih tahan kondisi yang tidak menguntungkan termasuk adanya bahan sanitasi, terlihat bahwa pada konsentrasi aplikasi yang lebih tinggi, jumlah bakteri yang direduksi lebih rendah dibandingkan dengan bakteri planktoniknya.



Gambar 5. Reduksi densitas biofilm *S. Typhimurium* oleh sanitaisir kombinasi

Oxyquart[®] lebih efektif dalam mereduksi biofilm *S. Typhimurium* dan *S. aureus* dibandingkan dengan Bioclean 540[®]. Analisis statistik (Tabel 2) menunjukkan bahwa penggunaan Oxyquart[®] 0.125% tidak berbeda nyata dengan Bioclean 540[®] 0.5% dalam mereduksi biofilm *S. Typhimurium*, sementara Oxyquart[®] 1% paling efektif dalam mereduksi *S. aureus*.

Oxyquart[®] mengandung komponen quat yang lebih dominan sehingga dapat diharapkan lebih efektif dalam mereduksi biofilm. Menurut Marriot (1999), quat merupakan sanitaisir sekaligus surfaktan kationik sehingga quat juga memiliki kemampuan pembersihan (*cleaning*).



Gambar 6. Reduksi densitas biofilm *S. aureus* oleh sanitaisir kombinasi

Tabel 2. Analisis statistik untuk reduksi densitas biofilm

| Sanitaisir | Konsentrasi penggunaan (%v/v) | Reduksi densitas biofilm (log CFU/cm ²) | |
|---------------------------|-------------------------------|---|---------------------------|
| | | <i>S. Typhimurium</i> | <i>S. aureus</i> |
| Oxyquart [®] | 0.125 | 5.02 ± 0.18 ^a | 1.65 ± 0.66 ^{cd} |
| | 0.25 | 5.02 ± 0.18 ^a | 2.21 ± 0.33 ^{bc} |
| | 0.5 | 5.02 ± 0.18 ^a | 2.90 ± 0.07 ^b |
| | 1 | 5.02 ± 0.18 ^a | 3.94 ± 0.19 ^a |
| Bioclean 540 [®] | 0.125 | 1.68 ± 0.05 ^c | 0.72 ± 0.62 ^d |
| | 0.25 | 3.71 ± 0.86 ^b | 1.01 ± 0.36 ^d |
| | 0.5 | 4.70 ± 0.11 ^a | 1.53 ± 0.31 ^{cd} |
| | 1 | 4.70 ± 0.11 ^a | 2.73 ± 0.08 ^b |

Sebagai deterjen (bahan pembersih), quat dapat melarut-kan EPS biofilm sehingga sanitaisir memperoleh akses untuk kontak dengan sel bakteri, selanjutnya quat sebagai sanitaisir akan bereaksi dengan dinding sel bakteri dan menyebabkan kebocoran sel (Simoes *et al.* 2006, Grinstead 2009). Simoes *et al.* (2006) menyarankan bahwa langkah penting mencegah pembentukan biofilm adalah mengaplikasikan pembersihan yang dilanjutkan dengan sanitasi. Penelitian Pan *et al.* (2006) menunjukkan bahwa *Listeria monocytogenes* dalam bentuk biofilm bersifat resisten terhadap sanitaisir peroksi asetat, quat dan klorin, tetapi ketika lapisan pelindungnya (EPS) larut oleh bahan pembersih maka tidak terjadi sifat resisten terhadap sanitaisir tersebut.

Dari Tabel 2, terlihat bahwa biofilm *S. aureus* lebih sulit direduksi dibandingkan biofilm *S. Typhimurium*, baik oleh Oxyquart[®] maupun Bioclean 540[®]. Rossoni dan Gaylarde (2000) menunjukkan bahwa biofilm *S. aureus* lebih resisten terhadap peroksi asetat dibandingkan bakteri lainnya. Resistensi biofilm *S. aureus* terhadap sanitaisir diduga terjadi karena adanya natrium klorida dan glukosa dalam medium TSB. Moretro *et al.* (2003) melaporkan bahwa biofilm *Staphylococcus* lebih tebal dengan adanya natrium klorida dan glukosa. Oleh karena itu, dibutuhkan konsentrasi bahan pembersih dan sanitaisir yang lebih tinggi.

KESIMPULAN

Dari keenam jenis sanitaisir komersial yang diuji, PAA, Oxyquart® maupun Bioclean 540® efektif menginaktivasi sel planktonik *S. Typhimurium* dengan nilai reduksi 9 log CFU/mL. Sel planktonik *S. aureus* lebih sensitif terhadap sanitaisir komersial dibandingkan dengan *S. Typhimurium* dan dapat dinaktifkan dengan konsentrasi sanitaisir lebih rendah. Biofilm *S. Typhimurium* maupun *S. aureus* memerlukan konsentrasi sanitaisir lebih tinggi. Oxyquart® lebih efektif dalam menginaktivasi sel biofilm dibandingkan dengan Bioclean 540®. Meskipun sel planktonik *S. aureus* relatif sensitif terhadap sanitaisir, biofilm *S. aureus* memerlukan konsentrasi sanitaisir lebih tinggi untuk inaktivasinya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT Kevin Chemindo Anugerah, Jakarta yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2012. Laporan tahun 2011 [Internet]. [diunduh 2013 Februari 11]. Tersedia pada: http://www.pom.go.id/ppid/rar/LAPTAH_2011.pdf.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States 2009-2010. 62(3):41-47.
- [CFR] Code of Federal Regulations. 2011. Indirect food additives: adjuvants, production aids, and sanitizers: substances utilized to control the growth of microorganism. Washington DC: US FDA.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. 32(2):52.
- Dewanti R, Wong ACL. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. Int J Food Microbiol 26 :147-164
- [FDA] Food and Drug Administration. 1986. *Hydrogen peroxide*. Code of Federal Regulations 21, Parts 170-199, Section 184.1366, pp506-507.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological analytical manual chapter 12 *Staphylococcus aureus* [Internet]. [diunduh 2013 Maret10]. Tersedia pada: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.htm>.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2009. FDA report on the occurrence of foodborne illness risk factors in selected institutional foodservice, restaurant, and retail food store types [Internet]. [diunduh 2013 Februari 11]. Tersedia pada: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/Foodborne-IllnessandRiskFactorReduction/RetailFoodRiskFactorStudies/UCM224682.pdf>.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. Bacteriological analytical manual chapter 5 *Salmonella* [Internet]. [diunduh 2013 Maret 10]. Tersedia pada: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>.
- [WHO] World Health Organization. 2007. Food safety and foodborne illness. Geneva: WHO.
- Gaulin C, Le ML, Shum M, Fong D. 2011. Disinfectants and sanitizers for use on food contact surfaces. Canada: National Colaborating Centre for Environmental Health.
- Grinstead D. 2009. Cleaning and Sanitation in Food Processing Environment for the Prevention of Biofilm Formation and Biofilm Removal. Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, editors. Biofilm in the food and beverage industries. Boca Raton: CRC Press.
- Lehmann RH. 1988. Synergisms in Disinfectant Formulations. Payne KR, editor. Industrial biocides, hal 68-90. Chichester: John Wiley Sons,
- Marques SC, Rezende JdGOS, Alves LAdF, Silva BC, Alves E, Abreu LRd, Piccoli RH. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. Brazilian J Microbiol 38:538-543.
- Marriott NG. 1999. Principles of Food Sanitation 4th edition. Gaithersburg (MD): Aspen.
- Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion Locus ica among *Staphylococci* from food and food processing environments. Appl Environ Microbiol 69(9):5648-5655.
- Pan Y, Breidt F, Kathariou S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl Environ Microbiol 72:7711-7717.
- Preuss HG, Echard B, Dadgar A, Talpur N, Manohar V, Eniq M, Baqchi D, Ingram C. 2005. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo studies [Internet]. [diunduh 2013 Maret 10]. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021093>.
- Rodgers SL, JN Cash, M Siddq, ET Ryser. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. J Food Prot. 67:721-731.
- Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. Int J Food Microbiol 61(1):81-85.
- Rutala WA, Weber DJ. 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities [Internet]. [diunduh 2013 April 17]. Tersedia pada: http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/4_0efficacyDS.html.

- Simoes M, Simoes LC, Machado I, Pereira MO, Vieira MJ. 2006. Control of flowgenerated biofilms using surfactantsevidence of resistance and recovery. *Food Bioprod Processing*. 84:338-345.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira M. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci Technol* 43:573-583.
- Srey S , Jahid IK, Ha S-D. 2013. Biofilm formation in industries : a food safety concern. *Food Control* 31:572-585
- Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease, part 3, factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. *J Food Prot* 70(9):2199-2217.
- Widiyarti G, Hanafi M, Soewarso WP. 2009. Kajian awal sintesis monolaurin sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*. *Indonesian J Chem* 9(1): 99-106.
- Zhang H, Wei H, Cui Y, Zhao G, Feng F. 2009. Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. *J Food Sci*. 74:418-421.

JMP08-14-003 - Naskah diterima untuk ditelaah pada 29 Agustus 2014. Revisi makalah disetujui untuk dipublikasi pada 09 September 2014. Versi Online: <http://journal.ipb.ac.id/index.php/jmp>