

Review Singkat *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*: Patogen baru pada susu formula bayi

Concise Review *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*: Emerging pathogen in infant milk formulae

Anton Rahmadi, STP MSc

Peneliti Mikrobiologi Pangan pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Mulawarman. Alumni University of New South Wales, Sydney, Australia. Email: arahmadi@unmul.ac.id

Dimuat di Bunga Rampai Buletin Bappeda Propinsi Kalimantan Timur edisi November 2008.

Abstract

Cronobacter is a newly proposed genus for Enterobacter sakazakii and its subspecies. These bacteria have been well known to cause infant diarrhoea. In many recent research, C. sakazakii has been regarded as an emerging pathogen that is requested to be tightly controlled in milk industry. However, a report of C. sakazakii in infant milk formulae in Indonesia has revealed that many food whistleblowers did not well informed about the nature of these bacteria. Therefore, this concise review will try to give more information in relation to the current knowledge and detection technique of C. sakazakii and a proposed action to be taken in households to avoid the potential danger of infant diseases caused by C. sakazakii.

Keywords: Cronobacter, E. sakazakii, infant milk formulae, detection technique

Pendahuluan

Kegemparan susu berbakteri dimulai saat diumumkannya hasil riset Estutiningsih dkk (2006) kepada publik di awal tahun 2008. Tim peneliti menyebutkan 20% dari sampel susu formula bayi asal Indonesia terkontaminasi oleh *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. Makanan bayi pun tidak luput dari kontaminasi bakteri ini, dengan memberikan angka 40% dari populasi sampel yang diteliti. Sekalipun demikian, Balai POM lalu melakukan uji yang sama dari seluruh susu infan yang beredar di Indonesia dengan hasil negatif.

Keberadaan *C. sakazakii* ini di produk susu formula menjadi mencuat dan menjadi medium kontaminasi yang dominan karena produk ini pada umumnya dikenal sebagai produk yang aman untuk langsung dikonsumsi bayi tanpa memerlukan

pemrosesan lebih lanjut. Asumsi-asumsi inilah yang sebenarnya harus ditilik kembali (Kandhai dkk, 2004).

Asumsi-asumsi yang perlu dievaluasi atas kegiatan memberikan susu infan kepada balita

Asumsi pertama yang perlu dievaluasi: proses produksi susu di tingkat industri belum mengadopsi penanganan *emerging pathogens*, atau patogen-patogen baru seperti *Cronobacter sakazakii* ini. Dalam hal proses produksi, bagaimana *Cronobacter sakazakii* dapat sampai pada produk susu formula yang disiapkan secara aseptik masih terus diteliti. Ada kecurigaan bahwa bakteri ini bersifat *airborne* (mengkontaminasi lewat udara) pada industri susu dan rumah tangga (Kandhai dkk, 2004), sehingga diperlukan penanganan tambahan terhadap bakteri ini dalam mekanisme *Hazard Analysis Critical Control Point* (analisis titik penanganan kritis pada bahaya) di tingkat produksi susu formula.

Asumsi kedua yang perlu dievaluasi: Dalam kebiasaan penggunaan susu kaleng atau susu formula di tingkat pengguna rumahan, susu bayi pada umumnya disiapkan dengan proses yang minim pemanasan. Dalam hal ini, susu bayi biasanya hanya dicampur air hangat panas-panas kuku (suhu < 70°C), yang tidak cukup untuk mematikan bakteri ini.

Asumsi ketiga yang perlu dievaluasi: selama apa sebaiknya susu kaleng harus disimpan setelah dibuka atau pertama kali digunakan? Terdapat kebiasaan susu bubuk disimpan dalam kaleng ataupun plastik multi-lapisan pada suhu ruangan (20-27°C) untuk konsumsi hanya 1-4 hari, diasumsikan relatif aman karena kadar airnya yang rendah. Kenyataannya, dalam waktu relatif singkat, bakteri ini mampu menduplikasikan dirinya sehingga berbahaya untuk dikonsumsi balita dengan sistem imun yang rendah.

Asumsi keempat yang perlu dievaluasi: Para ibu sayang untuk membuang susu yang telah diencerkan atau susu sisa yang tidak habis dikonsumsi balitanya. Susu tersebut kemudian diletakkan begitu saja di suhu ruang dan diberikan kembali saat sang balita ingin minum susu. Penyimpanan pada suhu dingin merupakan hal yang tidak umum pada produk susu bubuk. Padahal, pertumbuhan *C. sakazakii* dilaporkan dapat direduksi dengan penyimpanan pada suhu dingin (Kim, Ryu, dan Buechat, 2006).

Kumpulan dari kebiasaan-kebiasaan yang dilakukan di tingkat rumah tangga dan kecepatan berkembang biak bakteri ini, *Cronobacter sakazakii* dalam jumlah cukup untuk menyebabkan penyakit (1 juta sel/g produk) pun dikonsumsi oleh bayi kita. Sifat alamiah dan karakteristik dari *Cronobacter sakazakii* sendiri akan dibahas pada subbahasan selanjutnya.

Mengenal *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*

Bakteri ini merupakan salah satu patogen yang pada tahun 1980 dipisahkan dari spesies *Enterobacter cloacae*, berdasarkan unsur genetik penyusunnya (Nazarowec-White dan Farber, 1997; Gurtler, 2005). Sebelumnya *E. sakazakii* dikenal dengan *yellow-pigmented cloacae* yang pertama kali dilaporkan oleh Pangalos di tahun 1929. *E.*

Sakazakii dimasukkan dalam tren perkembangan patogen dunia sejak tahun 2005 dan banyak diulas oleh para peneliti dari seluruh dunia (Skovgaard, 2007). *E. sakazakii* menjadi perhatian karena tingkat mortalitas yang tinggi (40-80%) pada bayi yang baru lahir (0-6 bulan), terutama sekali bayi prematur atau yang memiliki imunitas lebih rendah dari rata-rata bayi-bayi lainnya (Iversen dan Forsythe, 2003).

Di tahun 2008, saat klasifikasi taksonomi baru terhadap *Enterobacter sakazakii*, bakteri ini bersama dengan tujuh bakteri serupa lainnya digolongkan dalam genus yang baru, yaitu *Cronobacter*. Akhirnya, nama bakteri *Enterobacter sakazakii* ini diusulkan untuk berganti menjadi *Cronobacter sakazakii*. Akan tetapi, nama *Enterobacter sakazakii* masih tetap digunakan mengingat sebagian besar masyarakat masih mengenalinya demikian (Ghassem dkk, 2008; Iversen dkk, 2007)

Ekologi *C. sakazakii*

Sebagaimana erat tergabung dalam genus *Enterobacter*, *C. sakazakii* merupakan bakteri yang berkoloni di dalam saluran pencernaan manusia dewasa (Iversen, Druggan, dan Forsythe, 2004). Spesies *Cronobacter* ini dapat ditemukan di produk pangan lain selain susu formula: keju, daging, sayuran, biji-bijian, kondimen dan bumbu-bumbuan (Iversen dan Forsythe, 2003; Kim dkk, 2008; Fridemann, 2007; Lin dkk, 2007; Kim dkk, 2006).

C. sakazakii berkembang optimal pada kisaran suhu 30-40°C. Waktu regenerasi bakteri ini terjadi setiap 40 menit jika diinkubasi pada suhu 23°C, yang tentunya akan sedikit lebih cepat pada suhu optimum pertumbuhannya.

Kontaminasi satu koloni *C. Sakazakii* memiliki peluang hidup maksimum sebesar 6.5% untuk dapat berkembang hingga mencapai jumlah yang signifikan (1 juta sel/g produk) dalam waktu maksimal 100 jam pada suhu 18-37°C. Artinya, apabila 1 sel hidup *C. sakazakii* mengkontaminasi produk susu formula pada proses produksi. Hanya dalam 5 hari, produk tersebut telah menjadi sangat berbahaya bagi bayi. Angka probabilitas ini agaknya ditunjang dengan fakta hasil riset di seluruh dunia, tidak hanya yang dipublikasikan tim riset IPB, yaitu pada kisaran 20% (Iversen dan Forsythe, 2003; Kim dkk, 2008; Estutiningsih dkk, 2006).

Selain bersifat invasif, *C. sakazakii* juga memproduksi toksin (*endotoxin*) yang juga berbahaya bagi mamalia yang baru lahir dan belum memiliki sistem kekebalan yang baik (Townsend dkk, 2007).

Karakteristik utama *Cronobacter sakazakii*

Bakteri ini termasuk dalam golongan *Enterobacteriaceae*, memiliki Gram negatif, berbentuk rod (kapsul), tidak memproduksi spora. Dikelompokkan dalam genus *Cronobacter* karena tahan terhadap medium selektif vancomycin. Bakteri ini berkembang biak pada suhu optimum 44°C pada medium selektif *lauryl sulphate* yang telah diberi vancomycin (Rapid Microbiology, 2008a; Ghassem dkk, 2008; Iversen dkk, 2007; Skovgaard, 2007)

Bakteri ini dapat diisolasi dari sumber apapun di lingkungan kita (*ubiquitous*). *Cronobacter* erat kaitannya dengan kasus tingginya tingkat kematian akibat

mengonsumsi susu bayi formulasi yang tercemar (Ghassem dkk, 2008; Iversen dan Forsythe, 2003).

Teknik Deteksi

Dikarenakan bakteri *Cronobacter sakazakii* termasuk dalam *emerging pathogens* yang memerlukan teknik identifikasi sedikit berbeda, maka diperlukan pengetahuan cara identifikasi bakteri ini. Dalam teknik identifikasi yang normal dilakukan menggunakan metode konvensional, sering kali bakteri ini negatif, atau tidak berhasil diisolasi, tetapi sebenarnya ada. Dalam bahasa mikrobiologi, kesalahan ini kerap disebut *false negatif*.

Beberapa sebab mengapa bakteri ini susah diisolasi dengan metode konvensional adalah (1) kemampuan kompetitif yang rendah dibanding *coliform* untuk dapat tumbuh hidup (2) memerlukan medium yang sangat spesifik dan lingkungan hidup yang sangat spesifik, (3) sangat mudah mengalami *stress* saat ditumbuhkan di medium konvensional, dan (4) pada pengambilan sampel yang tidak baik, cenderung tidak ditemukan adanya koloni bakteri ini (Rapid Microbiology, 2008a; Lin dan Buechat, 2007; Iversen dkk, 2004).

Untuk mengatasi jumlah koloni yang terlampaui sedikit, sangat dianjurkan dilakukan *pre-enrichment* atau pengayaan awal. Standar Food Drug Agency (FDA) Amerika Serikat memberikan rekomendasi untuk menggunakan medium *Enterobacteriaceae enrichment* (EE) broth yang kemudian digoreskan ke atas medium agar VRBG. Koloni yang tumbuh dan diduga sebagai *C. sakazakii* selanjutnya disubkulturkan ke atas medium agar TSA. Pada medium TSA agar, koloni *C. sakazakii* akan berwarna kuning yang kemudian dikonfirmasi dengan tes kemampuan oksidase dan identifikasi biokimiawi. Metode lainnya yang dapat digunakan adalah menggunakan modifikasi larutan *lauryl sulphate* broth ditambah dengan vancomycin yang khusus digunakan untuk menseleksi bakteri-bakteri dari genus *Cronobacter* serta suhu inkubasi yang khusus pada 44°C (Rapid Microbiology, 2008a; Iversen dkk, 2004).

Setelah diperkaya, koloni terduga lalu dipindahkan dalam medium kromogenik sebagai medium selektifnya. Medium kromogenik akan meningkatkan aktivitas pertumbuhan *C. sakazakii* sekaligus menghambat bakteri-bakteri lainnya. Prinsip medium kromogenik adalah memberikan pengidentifikasian komponen alfa-glukosidase yang dihasilkan *C. sakazakii*, tetapi tidak diproduksi oleh *Enterobacteriaceae* lainnya (Rapid Microbiology, 2008a; Lin dan Buechat, 2007).

Pemekatan sel bakteri menjadi langkah berikutnya. Pemekatan berfungsi meningkatkan jumlah koloni aktif sehingga lapisan immunomagnetik dapat mengikat sel-sel target. Pada umumnya metode deteksi cepat memerlukan konfirmasi tingkat molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk secara pasti menyebutkan bahwa koloni terduga adalah *C. sakazakii*. Sekilas mengenai metode molekuler ini dibahas pada subbahasan selanjutnya.



Gambar 1. *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* yang tumbuh di atas medium spesifik buatan bioMérieux (Rapid Microbiology, 2008a).

Metode Deteksi Cepat

Menggunakan medium spesifik *C. sakazakii*

BioMérieux, sebuah perusahaan yang memproduksi media dan peralatan biokimia memperkenalkan produk chromID Sakazakii. Produk ini diklaim mampu mendeteksi *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* berdasarkan reaksi spesifik atas dua enzim yang dimilikinya: D-glucopyranosidase dan β D-cellobiosidase. Pendeteksian menggunakan enzim yang spesifik hanya terdapat pada bakteri ini menawarkan pendeteksian dengan tingkat keakuratan yang tinggi setelah inkubasi selama 24 jam. Validasi atas deteksi yang dilakukan dapat lebih cepat dengan menggunakan beberapa medium pengayaan dengan waktu inkubasi 35-37°C dan 41.5°C. (Rapid Microbiology, 2008b)

Menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* dan penanda (*marker*) khusus *C. sakazakii*

Liu dkk (2006) menggunakan TaqMan seri khusus (p/n 4382492) untuk mendeteksi *C. sakazakii*. Kit yang secara khusus didesain oleh TaqMan digunakan untuk meningkatkan reliabilitas dan tingkat kesuksesan deteksi *C. sakazakii*. Kit ini memiliki cara identifikasi berdasarkan kriteria (1) Nilai positif akan dihasilkan jika ditemukan DNA spesifik *C. sakazakii*. DNA spesifik tersebut adalah yang berkaitan dengan kemampuan ekspresi enzim D-glucopyranosidase dan β D-cellobiosidase ataupun kemampuan produksi alfa-glukosidase (2) DNA organisme yang mirip *C. sakazakii* namun tidak memiliki kemampuan memproduksi enzim spesifik tersebut akan dinilai negatif (3) Kontrol negatif akan menghasilkan sinyal nilai negatif. Validasi dari metode PCR menggunakan penanda TaqMan ini harus dilakukan di laboratorium terakreditasi dan berpengalaman menangani *C. sakazakii*. (Applied Biosystem, 2008).

Sosialisasi penanganan *Cronobacter sakazakii* kepada masyarakat

Tiga dampak utama yang mungkin timbul setelah mencuatnya kasus *C. sakazakii* ini adalah ditudingnya *brand* tertentu sebagai susu yang tercemar bakteri, masyarakat mengalihkan konsumsi susu formula ke susu segar yang belum tentu terjamin pula higienitas serta keamanan mikrobiologisnya, serta penggunaan pengganti susu seperti air rendaman beras (tjain) maupun susu kedelai yang tingkat nutrisinya berbeda (Rahmadi, 2008). Dalam upaya melakukan sosialisasi bahwa susu formula aman dikonsumsi, BPOM telah melakukan *press release* yang cukup baik dengan mengumumkan secara besar-besaran bahwa susu formula yang belum dibuka atau berasal dari pabrik Indonesia aman, tidak mengandung *C. sakazakii*.

Akan tetapi, upaya untuk membuka kembali kasus *C. sakazakii* oleh sebagian golongan masyarakat ternyata masih tampak diberitakan. Oleh karena itu, masyarakat yang terlanjur takut memberikan susu formula balita perlu untuk diinformasikan kembali, bahwa:

1. Kontaminasi *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* berbahaya bagi bayi usia 0-6 bulan dan merupakan ancaman bagi bayi pada usia 6-12 bulan, terutama bayi lahir prematur atau bayi dengan daya tahan rendah.
2. Tidak perlu cemas karena pada umumnya keberadaan *C. sakazakii* di dunia dan di Indonesia hanya berada pada kisaran sangat rendah dari populasi produk susu formula, sebagai akibat kesalahan proses di tingkat industri yang bersifat kasuistik. Hampir semua kasus penemuan *C. sakazakii* adalah secara sporadis, tidak tergantung dari *brand* produk tersebut.
3. Riset-riset terakhir oleh BPOM maupun Ghassem dkk (2008) menyatakan bahwa proses produksi susu balita yang keluar dari industri susu asal Indonesia dan Malaysia aman terhadap kontaminasi *C. sakazakii* ini.

Langkah antisipatif terhadap cemaran *Cronobacter sakazakii*

C. sakazakii dapat mengkontaminasi pada tahap pembuatan susu di tingkat rumahan mengingat bakteri ini ada dimana-mana. Ghassem, dkk (2008) mengatakan, pada umumnya kontaminasi bakteri ini dikarenakan sanitasi dan higienitas yang kurang baik di tingkat rumah tangga maupun *pantry* rumah sakit.

Sesuai dengan credo bahwa mencegah lebih baik dari pada mengobati, masyarakat perlu diinformasikan bagaimana cara mencegah agar susu yang dikonsumsi para balita tidak tercemar bakteri *C. sakazakii*. Atau seandainya pun terdapat bakteri *C. sakazakii* dalam susu tersebut, masyarakat dapat melindungi balita-balita mereka dengan beberapa upaya yang secara klinis dianggap mampu mematikan patogen ini. Yang perlu diperhatikan oleh masyarakat adalah:

1. Bila sebelumnya susu bayi cukup dicampur dengan air hangat, maka sekarang cobalah untuk merendam susu bubuk dengan air panas (85-100°C) selama 1-2 menit sebelum ditambahkan air dingin untuk mereduksi jumlah koloni hidup bakteri.
2. Tidak menggunakan produk susu bubuk yang kemasannya telah terbuka cukup lama (lebih dari 8 hari) atau dibeli dalam kemasan yang sudah tidak baik atau bocor.

3. Simpanlah susu bubuk yang telah dibuka kemasannya di dalam lemari pendingin (suhu <math><5^{\circ}\text{C}</math>) untuk mencegah pertumbuhan mikroba, bukan hanya *C. sakazakii*.
4. Cucilah bahan makanan yang biasa dimakan mentah dengan sanitiser, bukan hanya air mengalir, untuk mereduksi kontaminasi mikroba pada bahan pangan tersebut.
5. Konsultasikan dengan dokter/tenaga medis terhadap penggunaan susu formula bagi bayi berusia 0-6 bulan, terutama sekali bayi lahir prematur atau yang memiliki daya tahan lemah.
6. Waspada terhadap gejala demam dan diare yang merupakan indikasi infeksi, apapun mikroorganismenya, bukan hanya *C. sakazakii*.

Saran untuk Industri

Adapun saran bagi kalangan industri yang memproduksi susu agar melakukan evaluasi terhadap proses produksi susu formula bayi secara menyeluruh. Hal ini dimungkinkan dengan memasukkan *C. sakazakii* dalam sistem monitoring, terutama HACCP yang telah ada.

Daftar pustaka

- Applied Biosystem. 2008. TaqMan® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit. Commercial Brochure.
- Estutiningsih, S. Kress, C., Hassan, A. A., Akineden, M., Shneider, E., Usleber, E. 2006. *Enterobacteriaceae* in Dehydrated Powdered Infant Formula Manufactured in Indonesia and Malaysia. *Journal of Food Protection*, 69(12): 3013–3017.
- Friedemann. Miriam., 2007. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 1–10.
- Ghassem, M., Sani, N. M. Babji, A. S. Presence of Pathogenic Organism (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula milk. Prosiding Seminar Nasional PATPI Palembang 14-16 Oktober 2008. Makalah nomor MKP-11, dalam proses cetak.
- Gurtler, Joshua B., Jeffrey L. Kornacki, Larry R. Beuchat. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology* 104 (2005) 1– 34.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidla, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., dan Joosten H. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies. *BMC Evolutionary Biology* 7:64 doi:10.1186/1471-2148-7-64.
- Iversen, Carol ., Stephen Forsythe. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula from powdered infant formula milk and related products. *Trends in Food Science & Technology* 14 (2003) 443–454.
- Iversen, Carol., Patrick Druggan, Stephen Forsythe. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 96 (2004) 133– 139.
- Iversen, Carol., Stephen Forsythe. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae*. *Food Microbiology* 21 (2004) 771–777.

- Kandhai, M Chantal, Martine W Reij, Leon G M Gorris, Olivier Guillaume-Gentil, Mike van Schothorst. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 2004; 363: 39–40.
- Kim, Hoikyung., Jee-Hoon Ryu, Larry R. Beuchat. 2006. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. *International Journal of Food Microbiology* 111 (2006) 134–143.
- Kim, Kyumson., Sung Sik Jang, Sung Ki Kim, Jong-Hyun Park, Sunggi Heu, Sangryeol Ryu. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *International Journal of Food Microbiology* 122 (2008) 196–203.
- Lin, Li-Chun., Larry R. Beuchat. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiology* 24 (2007) 767–777.
- Liu, Yin., Xiaoning Cai, Xia Zhang, Qili Gao, Xiaochuan Yang, Zejun Zheng, Maohuang Luo, Xitai Huang. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods* 65 (2006) 21– 31.
- M. Nazarowec-White, J.M. Farber. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology* 34 (1997) 103 - 113.
- Rahmadi, A. 2008. Berbahaya Jika Sistem Imun Lemah: Potensi Dampak *E. sakazakii* terhadap Konsumsi Susu Balita. Artikel Populer pada Kaltim Post edisi 3 Maret 2008.
- Rapid Microbiology 2008a. *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* Detection and Identification Methods. Diambil dari: <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Enterobacter-sakazakii.php>, dikunjungi 25 Oktober 2008.
- Rapid Microbiology. 2008b. *bioMérieux Launches Two Innovative Chromogenic Media for Food-Borne Pathogens*. Diambil dari: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/51h26.php> dikunjungi 25 Oktober 2008.
- Skovgaard, Niels. 2007. New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 120 (2007) 217–224.
- Townsend, Stacy ., Juncal Caubilla Barron, Catherine Loc-Carrillo, Stephen Forsythe. 2007. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiology* 24 (2007) 67–74.