

BIOTIPE ISOLAT LOKAL ENTEROBACTER SAKAZAKII

*Iza Ayu Saufani¹, Ratih Dewanti-Hariyad², Sri Hendrastuti Hidayat³

¹Program Studi Ilmu Gizi, Universitas Mohammad Natsir, Bukittinggi 26136

²Fakultas Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

³Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

*email: saufani@yahoo.com

Submitted: 16-05-2016, Reviewed: 16-05-2016, Accepted: 17-05-2016

<http://dx.doi.org/10.22216/jit.2016.v10i1.429>

Abstract

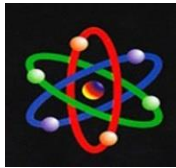
Enterobacter sakazakii has been classified into 16 biogroups based on its biochemical characteristics and into 3 biogroups based on 20 biochemical tests by rapid kit API 20E. In 2007, Iversen was reclassified *Enterobacter sakazakii* into *Cronobacter* spp. This research aimed to classify local isolates of *Enterobacter sakazaki* which had been identified and confirmed previously based on partial gene encoding for 16S rRNA by PCR. Classification based on biochemical properties was conducted using rapid kit RapID ONE[®] and four biochemical reactions of Iversen. Identification using RapID ONE[®] was then compared with that previously using API 20E. Identification using RapID ONE[®] suggests that of the 19 isolates studied, 9 were identified as *Enterobacter sakazakii*, 9 as *Enterobacter cloacae* and 1 isolate was *Enterobacter cancerogenus*. When compared to the identification performed using API 20E, 8 isolates were commonly identified as *Enterobacter sakazakii*. Based on the test responses using RapID ONE[®], the 19 isolates can be classified into 16 biotypes. When the isolates were tested for the 4 biochemical tests of Iversen, 15 of the 19 isolates were identified as *Cronobacter* spp. The remaining 4 isolates were not identified as *Cronobacter* spp. An addition of one biochemical test for pyrrolidonyl is proposed to be done to appropriately identify the bacteria as *Cronobacter* spp..

Keywords: API 20E, biotyping, *Cronobacter* spp., pyrrolidonyl test, RapID ONE

Abstrak

Enterobacter sakazakii telah diklasifikasikan ke dalam 16 biogrup berdasarkan sifat biokimianya dan menjadi 3 biogrup berdasarkan 20 reaksi biokimia dengan perangkat cepat API 20E. Pada tahun 2007, Iversen mengklasifikasi ulang *Enterobacter sakazakii* menjadi *Cronobacter* spp.. Penelitian ini bertujuan untuk mengelompokkan *Enterobacter sakazakii* yang telah diisolasi dan terkonfirmasi menggunakan PCR berdasarkan gen penyandi 16S rRNA-nya pada penelitian sebelumnya. Pengelompokan dilakukan dengan menggunakan perangkat cepat RapID ONE[®] dan 4 reaksi biokimia Iversen. Hasil klasifikasi menggunakan RapID ONE[®] kemudian dibandingkan dengan hasil klasifikasi menggunakan API 20E yang telah dilaporkan sebelumnya. Dengan menggunakan RapID ONE diperoleh 9 isolat *Enterobacter sakazakii*, 9 isolat *Enterobacter cloacae* dan 1 isolat *Enterobacter cancerogenus* dari 19 isolat yang diteliti. Kesembilan belas isolat uji tersebut dapat dikelompokkan menjadi 16 biotipe. Jika dibandingkan dengan menggunakan API 20E, terdapat 8 isolat yang juga teridentifikasi sebagai *Enterobacter sakazakii*. Berdasarkan 4 reaksi biokimia Iversen, 15 dari 19 isolat di atas dapat diklasifikasikan ke dalam *Cronobacter* spp. Uji pirolidonil disarankan untuk mengklasifikasikan 4 isolat yang tidak terklasifikasi dengan 4 reaksi biokimia Iversen.

Kata Kunci: API 20E, biotipe, *Cronobacter* spp., uji pirolidonil, RapID ONE



PENDAHULUAN

Cronobacter spp. yang dahulu dikenal dengan nama *Enterobacter sakazaki* mula-mula dibedakan dari *E. cloacae* karena memiliki pigmen kuning (Farmer, Asbury, Hickman, & Brenner, 1980). Bakteri ini digolongkan sebagai mikroorganisme patogen kategori B karena dapat mengakibatkan infeksi meningitis, *septicemia* dan *necrotizing enterocolitis* (NEC) yang berbahaya pada bayi kelompok tertentu (Muytjens, Zanen, Sonderkamp, & Kollee, 1983)(Acker et al., 2001) melalui konsumsi susu formula. Bakteri patogen ini bisa diisolasi dari bahan pangan seperti sayuran, buah-buahan, minuman tradisional, biji-bijian, bahan rempah dan susu formula serta lingkungan disekitar sampel yang terdeteksi positif *Cronobacter* spp. (Jaradat, Ababneh, Saadoun, Samara, & Rashdan, 2009). Di Indonesia *E. sakazakii* diisolasi dari susu formula bubuk sebesar 12.5% pada tahun 2006, 13% dari makanan bayi pada tahun (Dewanti-hariyadi, Nuraida, Gitaprawati, Immaningsih, & Hariyadi, 2009), tetapi survei nasional pada tahun 2011 melaporkan tidak ditemukannya patogen ini dari seluruh sampel susu formula yang diteliti (n=64) (SEAFast (Southeast Asian Food & Agricultural Science & Technology) Center, 2011). Di negara lain frekuensi isolasi bakteri ini dari susu formula adalah 6.6% di Jepang (Oonaka, Furuhashi, Hara, & Fukuyama, 2010), 5% di Kenya (Gökmen & Kaan, 2010) dan 13% di Adibjan (Yao et al., 2012).

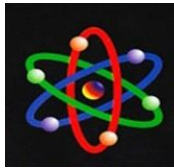
(D. Gitaprawati, Dewanti-Hariyadi, & Hidayat, 2012) melaporkan bahwa isolat lokal *E. sakazakii* yang diperoleh dari susu formula, makanan bayi, tepung-tepungan dan rempah di Indonesia tidak memiliki keragaman genetik yang tinggi berdasarkan gen parsial 16S rRNA. Akan tetapi tidak diketahui apakah isolat-isolat tersebut dapat

diklasifikasi berdasarkan sifat biokimiawinya. Sebelumnya, *E. sakazakii* dikelompokkan menjadi 15 biogrup berdasarkan produksi indol, motilitas pada suhu 36 °C, produksi asam inositol, dulsitol, α -methyl-D-glukosidase, pemanfaatan malonat, ornitin, *methyl red* dan *Voges-Proskauer* (VP)(Farmer et al., 1980). Kemudian (C Iversen, Waddington, Farmer, & Forsythe, 2006) menambahkan biogrup 16 berdasarkan profil reaksi positif terhadap inositol dan dulsitol serta reaksi negatif untuk indol.(Nazarowec-White & Farber, 1999) mengelompokkan *E. sakazakii* menjadi 3 biogrup berdasarkan profil biokimia menggunakan kit API 20E. Ketika (Carol Iversen et al., 2007) mengusulkan klasifikasi ulang *E. sakazakii* menjadi *C. sakazakii* subsp. *sakazakii*, *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. turicensis* maka 4 reaksi biokimia yaitu produksi asam dari dulsitol, produksi asam dari *methyl- α -D-glucoside*, produksi indol dan pemanfaatan malonat juga digunakan sebagai piranti klasifikasi disamping sifat-sifat genotipenya. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan klasifikasi isolat lokal *C. sakazakii* berdasarkan sifat-sifat biokimiawinya.

METODE PENELITIAN

Persiapan Kultur.

Sembilan belas isolat *C. sakazakii* yang digunakan adalah isolat-isolat lokal yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya (Estuningsih, Holtkötter, Hassan, Schneider, & Usleber, 2006)(D. Gitaprawati et al., 2012)(Hamdani, 2012)(Mutia, 2008). Isolat-isolat tersebut telah dikonfirmasi sebagai *Cronobacter* spp. dengan menggunakan PCR terhadap gen parsial 16S rRNA. Isolat disebarkan pada media BHI broth (Oxoid, UK) dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Satu ose isolat dari BHI broth dipindahkan



pada media TSA (Oxoid, UK). Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diperoleh kultur kerja.

Biotipe Isolat Lokal *Cronobacter* spp. dengan RapID onE.

Setiap sampel isolat lokal diidentifikasi dengan melakukan menguji 19 sifat biokimiawinya dengan perangkat cepat RapID onE (Remel, USA). Hasil pengujian dianalisis menggunakan perangkat lunak RapID onE. Hasil identifikasi dengan perangkat cepat RapID onE dibandingkan dengan hasil API 20E yang telah dilaporkan sebelumnya (Desty Gitaprawati, 2011)(Hamdani, 2012). Selain itu, karakteristik sifat biokimia yang diuji dengan perangkat cepat RapID onE diamati secara manual untuk melihat pola spesifik hasil pengujian yang dihasilkan oleh masing-masing isolat uji. Isolat-isolat yang memiliki karakteristik biokimia yang sama akan diklasifikasikan dalam satu biotipe.

Biotipe Isolat Lokal *Cronobacter* spp. dengan 4 Reaksi Biokimia (modifikasi Iversen et al. 2007).

Biotipe dilakukan berdasarkan kemampuan isolat dalam memproduksi asam dari dulsitol dan dari *methyl- α -D-glukosidase*, kemampuan memproduksi indol dan pemanfaatan malonat. Modifikasi metoda (Carol Iversen et al., 2007) pada penelitian ini yakni pengujian reaksi malonat, indol dan *p-nitrophenyl- β -D-glukosidase* diperoleh dari hasil uji dengan perangkat cepat RapID onE, sedangkan untuk mengetahui kemampuan produksi asam dari dulsitol dilakukan dengan menyediakan larutan steril phenol red broth yang mengandung 0.5% (m/v) dulsitol. Sampel pada kultur kerja diinokulasikan

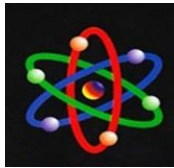
pada larutan tersebut selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dari perubahan warna merah menjadi kuning.

HASIL

Identifikasi dan Klasifikasi Isolat Lokal *Cronobacter* spp. berdasarkan RapID onE.

Dari hasil identifikasi menggunakan perangkat cepat RapID onE ternyata hanya 9 dari 19 isolat teridentifikasi sebagai *E. sakazakii* (FWH d2c, FWH d14, FWH d1, FWH b11, FWH d2u, FWH d11, FWH b6, FWH d12 dan DES c13) dengan tingkat kemiripan antara 93.9 hingga 99.9%. Sembilan dari 19 isolat lainnya (FWH b2, FWH d16, FWH b15, DES c7, 6a, YR c3a, YR t2a, DES b10 dan DES b7a) teridentifikasi sebagai *E. cloacae* dengan tingkat kemiripan 99.5-99.9% dan satu isolat (FWH c3) teridentifikasi sebagai *E. cancerogenus* (63.7%).

Jika hasil identifikasi antara RapID onE dan API 20E dibandingkan, 8 dari 19 isolat uji (FWH b6, FWH b11, FWH d1, FWH d2c, FWH d11, FWH d12 dan FWH d14) sama-sama teridentifikasi sebagai *E. sakazakii*. Tujuh dari 19 isolat uji (DES b7a, DES b10, YR c3a, YR t2a, FWH b2, FWH b15 dan FWH d16) teridentifikasi sebagai *E. cloacae* dengan RapID onE tetapi teridentifikasi sebagai *E. sakazakii* dengan API 20E. Satu isolat (DES c13) yang diisolasi dari maizena teridentifikasi sebagai *E. sakazakii* berdasarkan RapID onE teridentifikasi sebagai *Rahnella aquatilis* menggunakan API 20E. Satu isolat DES c7 teridentifikasi sebagai *E. cloacae* berdasarkan RapID onE dan teridentifikasi sebagai *Pantoea* spp.3 berdasarkan API 20E.



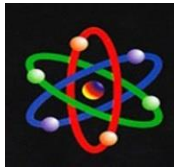
Tabel 1. Biotipe Isolat Lokal *E. sakazakii* Berdasarkan 10 Uji Biokimia

Isolate Coda	MAL	SBL	β GLU	PYR	NAG	LDC	IND	ADON	LIP	β XYL	Biotipe
FWH d12	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	I
FWH b6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	II
FWH c3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	III
FWH d14	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	IV
FWH d2c	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	V
6a	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	VI
FWH d16	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	VII
YR t2a	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	VII
DES b7a	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	VIII
FWH b11	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	IX
FWH b2	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	X
FWH d1	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	XI
FWH d2u	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	XII
FWH d11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	XIII
DES c13	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	XIV
FWH b15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	XV
YR c3a	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	XVI
DES b10	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	XVI
DES c7	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	XVI

MAL: malonat; SBL: sorbitol; β GLU: p-nitrophenil- β -D-glucosid; PYR: pirolidonil, NAG: p-nitrophenil-N-asetil- β -D-glukoamid; LDC: produksi lisin; IND: indol; ADON: fermentasi adonitol; LIP: produksi asam lemak ester dan β XYL: p-nitrophenil- β -D-xilosid

Sepuluh dari 19 uji biokimia pada RapID onE diketahui memiliki profil biokimia yang beragam antar isolat lokal *Cronobacter* spp. Reaksi-reaksi tersebut adalah pemanfaatan malonat, sorbitol, metabolisme substrat p-nitrophenil- β -D-glucosid, pirolidonil, p-nitrophenil-n-asetil- β -D-glukoamid, produksi lisin, indol, fermentasi adonitol, produksi asam lemak ester dan memetabolisme substrat p-nitrophenyl- β -D-xilosid. Berdasarkan 10 profil biokimia tersebut, isolat-isolat lokal

Cronobacter spp. dapat digolongkan menjadi 16 biotipe. Pengelompokan masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 1. Isolat FWH d12 tergolong biotipe I, isolat FWH b6 merupakan biotipe II, isolat FWH c3 adalah biotipe III, isolat FWH d14 merupakan biotipe IV, isolat FWH d2c merupakan biotipe V, isolat 6a merupakan biotipe VI, isolat FWH d16 dan YR t2a merupakan biotipe VII, isolat DES b7a merupakan biotipe VIII, isolat FWH b11 merupakan biotipe IX, isolat FWH b2 adalah



biotipe X, isolatFWH d1 merupakan biotipe XI, FWH d2u merupakan biotipe XII, isolatFWH d11 merupakan biotipe XIII, isolat DES c13 merupakan biotipe XIV,

isolat FWH b15 merupakan biotipe XV, serta isolat YRc3a, DES b10 dan DES c7 merupakan biotipe XVI.

Tabel 2 Klasifikasi isolat lokal *Enterobacter sakazakii* berdasarkan 4 uji biokimia Iversen

No	Kode Isolat	AMG (+/-)	Mal (+/-)	Ind (+/-)	Dul (+/-)	Klasifikasi
1	DES c13	-	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>
2	DES b7a	+	-	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>
3	DES b10	+	+	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>
4	YR t2a	+	-	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>
5	YR c3a	+	+	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>
6	6a	-	-	-	-	td
7	DES c7	+	+	-	+	<i>Cronobacter turicensis</i>
8	FWH b15	+	+	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>
9	FWH d16	+	-	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>
10	FWH b2	+	+	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>
11	FWH c3	-	-	-	-	td
12	FWH b6	-	-	-	-	td
13	FWH d11	-	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>
14	FWH d2u	+	+	-	+	<i>Cronobacter turicensis</i>
15	FWH b11	+	+	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>
16	FWH d1	+	+	-	+	<i>Cronobacter turicensis</i>
17	FWH d14	+	-	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>
18	FWH d2c	+	-	-	-	<i>Cronobacter sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>
19	FWH d12	-	-	-	-	td

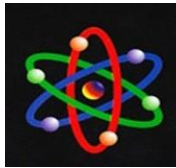
AMG = p-Nitopenil- β -D-glukosid; Mal = Malonat; Ind = Indol; Dul = Dulsitol; td = tidak terklasifikasi

Klasifikasi berdasarkan 4 reaksi biokimia Iversen.

Klasifikasi isolat-isolat lokal *E. sakazakii* ke dalam *Cronobacter* spp. berdasarkan 4 reaksi biokimia (Iversen *et al.* 2007) menghasilkan lima kelompok. Tabel 2 menyajikan kelima kelompok tersebut yakni *C. sakazakii* subsp. *sakazakii* yang terdiri dari 5 isolat, *C. sakazakii* subsp.

malonaticus yang terdiri dari 5 isolat, *C. muytjensii* yang terdiri dari 2 isolat dan *C. turicensis* yang terdiri dari 2 isolat sementara 4 isolat yang tidak teridentifikasi sebagai *Cronobacter*.

Jika diamati secara manual karakteristik profil biokimiawi dari 19 uji biokimia pada RapID onE, maka diketahui bahwa reaksi *pyrohydroxyl- β -*



naphthylamide memiliki pola yang spesifik untuk klasifikasi isolat-isolat lokal. Dengan melakukan pengujian terhadap reaksi pemanfaatan malonat, produksi asam dari dulcitol, produksi indol dan *pyrohydonyl-β-naphthylamide* (Tabel 3), maka isolat-isolat

lokal yang belum teridentifikasi ke dalam kelompok *Cronobacter* spp. (6a, FWH c3, FWH b6 dan FWH d12) dapat diklasifikasikan menjadi kelompok *C. sakazakii* subsp. *sakazakii*.

Tabel 3 Uji Biokimia untuk Isolat Lokal *Cronobacter* spp.

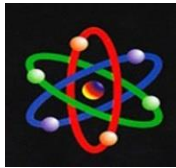
	<i>pyrohydonyl-β-naphthylamide</i>	Malonate	Indol	Dulcitol
<i>C.sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>	+	-	-	+
<i>C.sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>	-	+	-	-
<i>C.muytjensii</i>	+	+	+	+
<i>C.dublinensis</i>	+/-	+/-	+	-
<i>C.turicensis</i>	+	+	-	+

PEMBAHASAN

Isolat-isolat lokal pada penelitian ini merupakan isolat yang telah teridentifikasi dan terkonfirmasi sebagai *Cronobacter* spp. berdasarkan gen parsial 16S rRNA (D. Gitapratwi et al., 2012) (Hamdani, 2012). Akan tetapi, jika isolat-isolat ini diklasifikasikan berdasarkan sifat biokimiawinya menggunakan 19 uji dengan perangkat cepat RapID onE, isolat-isolat tersebut masuk ke dalam spesies *E. sakazakii*, *E. cloacae* dan *E. cancerogenus*. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh bank data pengujian yang masih terbatas yang masih mengacu pada nama lama *E. sakazakii*. (Carol Iversen et al., 2007) telah mengelompokkan ulang *E. sakazakii* menjadi 4 grup berdasarkan gen 16S rRNA, *amplified fragment length polymorphism* dengan *fluorescent* (f-AFLP), dan 4 reaksi biokimiawi menjadi *C. sakazakii* subsp *sakazakii*, *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* dan *C. dublinensis*.

Sembilan belas isolat lokal yang diteliti memiliki keragaman genetika yang

rendah (D. Gitapratwi et al., 2012), akan tetapi dapat dibedakan menjadi 16 biotipe berdasarkan sifat biokimiawi pada perangkat cepat RapID onE. Biotipe I merupakan isolat yang memiliki karakteristik reaksi negatif terhadap malonat dan p-nitrophenil-n-asetil-β-D-glukoamid. Biotipe II memiliki negatif terhadap malonat, sorbitol, p-nitrophenil-β-D-glukosid, lisin dan positif terhadap p-nitrophenil-n-asetil-β-D-glukoamid. Biotipe III terdiri dari isolat dengan karakteristik reaksi negatif terhadap p-nitrophenil-β-D-xilosid. Biotipe IV merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap malonat, sorbitol dan positif terhadap p-nitrophenil-β-D-glukosid dan lisin. Biotipe V merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap malonat, sorbitol dan lisin serta reaksi positif terhadap p-nitrophenil-β-D-glukosid. Biotipe VI merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap malonat, p-nitrophenil-β-D-glukosid dan positif terhadap sorbitol. Biotipe VII merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap malonat dan adonitol serta positif terhadap sorbitol. Biotipe VIII



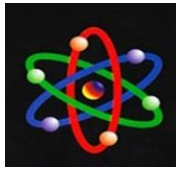
merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap malonat serta positif terhadap sorbitol dan adonitol. Biotipe IX merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol, pirolidonil dan positif terhadap malonat dan lisin. Biotipe X merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol, pirolidonil dan lisin serta positif terhadap malonat. Biotipe XI merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol dan p-nitrophenil-n-asetil- β -D-glukoamid serta positif terhadap malonat. Biotipe XII merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol dan indol serta positif terhadap malonat dan p-nitrophenil-n-asetil- β -D-glukoamid. Biotipe XIII merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol serta positif terhadap malonat dan indol. Biotipe XIV merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap sorbitol dan p-nitrophenil- β -D-glukosid serta positif terhadap malonat. Biotipe XV merupakan isolat yang memiliki reaksi negatif terhadap p-nitrophenil- β -D-glukosid serta positif terhadap malonat dan sorbitol. Sedangkan biotipe XVI terdiri dari isolat dengan karakteristik reaksi positif terhadap malonat, sorbitol dan p-nitrophenil- β -D-glukosid. (Farmer et al., 1980) melaporkan *E. sakazakii* terdiri atas 15 biotipe, namun dikelompokkan berdasarkan produksi indol, motilitas pada suhu 36 °C, produksi asam inositol, dulsitol, α -metil-D-glukosida, pemanfaatan malonat, ornitin, *methyl red* dan *Voges-Prokauer* (VP) dan ditambahkan biotipe 16 oleh (C Iversen et al., 2006) yang memberikan reaksi positif terhadap inositol dan dulsitol serta reaksi negatif untuk indol.

Dari pengujian biokimiawi pada penelitian ini diketahui bahwa *E. sakazakii* memiliki karakteristik umum reaksi positif terhadap arginin, ornitin, gula aldehyd, β -galaktosidase, p-nitrophenil- β -D-xilosid, T-

glutamyl- β -naptilamid, pirolidonil, penggunaan sitrat, produksi asetoin (uji VP), fermentasi sakarosa, melibiosa, amigladin, arabinosa, ramnosa dan manitol. Sebaliknya, *E. sakazakii* memberikan reaksi negatif terhadap produksi indol, produksi H₂S, adonitol, prolin- β -naptilamid, p-nitrophenil- β -D-glukoramid, asam lemak ester, aliiphatic thiol, fermentasi sorbitol dan urease.

Sorbitol dan adonitol adalah parameter pembeda spesies *E. sakazakii* dengan *E. cloacae* berdasarkan analisis RapID onE. (Stephan et al., 2008) menyatakan perbedaan profil biokimia isolat *E. sakazakii* dan *E. cloacae* adalah reaksi negatif dalam memfermentasi mucate dan sorbitol untuk isolat *E. sakazakii*. Menurut (Carol Iversen et al., 2007) *E. sakazakii* digolongkan ke dalam *Cronobacter* spp. karena memiliki karakteristik reaksi negatif terhadap D-sorbitol. Akan tetapi, isolat lokal FWH d16, FWH b15, DES c7, 6a, YR c3a, YR t2a, DES b10 dan DES b7a memberikan reaksi biokimia positif terhadap produksi sorbitol, sementara isolat-isolat FWH d2c, FWH d14, FWH d1, FWH b11, FWH d2u, FWH d11, FWH b6, FWH d12 dan DES c13 memberikan reaksi negatif (data tidak disajikan). Isolat FWH b2 memiliki reaksi biokimia positif terhadap adonitol, sehingga teridentifikasi sebagai *E. cloacae* padahal perangkat ini mensyaratkan *E. sakazakii* harus menghasilkan reaksi adonitol yang negatif.

Dengan mengetahui bahwa seluruh isolat yang digunakan adalah *Cronobacter* spp., maka dikaji hasil uji biokimia lain yang dapat digunakan untuk mengklasifikasikan 4 isolat yang masuk ke kelompok V (Tabel 3) ke dalam *Cronobacter* spp. diperlukandata uji pirolidonil. Sebenarnya (Chagla, Borczyk, Aldom, Rosa, & Cole, 1993) menyatakan bahwa uji pirolidonil merupakan



substrat yang digunakan untuk mendeteksi aktivitas *pyrrolidonyl peptidase* yang dapat membedakan bakteri Gram negatif dan Gram positif.

Jika hasil biotipe dengan perangkat RapID onE dibandingkan dengan 4 uji biokimiawi (Carol Iversen et al., 2007), maka biotipe I-VIII adalah spesies *C. sakazakii* subsp. *sakazakii*; biotipe IX, X, XV dan XVI adalah spesies *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*; biotipe XIII dan XIV adalah spesies *C. muytjensii*; serta biotipe XI, XII dan XVI adalah spesies *C. turicensis*. Masing-masing kelompok tersebut (*C. sakazakii* subsp. *sakazakii*, *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*, *C. muytjensii* dan *C. turicensis*) dapat dibedakan juga dengan karakteristik fenotip seperti pada Tabel 4.

Tabel 4 Karakteristik Fenotip *Cronobacter* spp.

KARAKTER	<i>C. sakazakii</i> subsp. <i>sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i> subsp. <i>malonaticus</i>	<i>C. muytjensii</i>	<i>C. turicensis</i>
MAL	-	+	+	+
SBL	v	v	-	(-)
βGLU	v	(+)	v	+
PYR	+	-	+	(+)
NAG	(+)	(+)	+	(+)
LDC	(-)	(-)	-	-
IND	-	-	+	-
ADON	(-)	(-)	-	-
LIP	-	-	v	-
βXYL	(+)	+	+	+

Mal: Malonat; SBL: Sorbitol; βGLU: p-nitrophenil-β-D-glukosid; PYR: pirolidonil; NAG: p-nitrophenil-n-asetil-β-D-glukoamid; LDC: Lisin; IND: Indol; ADON: Adonitol; LIP: Asam Lemak Ester; βXYL : p-nitrophenil-β-D-xilosid; - : 0-10% Positif; (-) : 10-30% Positif; v : 30-70% Positif; (+) : 70-90% Positif; + : 90-100% Positif

SIMPULAN

Klasifikasi secara biokimia baik dengan menggunakan perangkat cepat RapID onE maupun API 20E tidak memberikan hasil yang sesuai dengan analisa terhadap gen 16S rRNA yang telah dilakukan sebelumnya. Identifikasi menggunakan RapID onE menghasilkan 9 dari 19 isolat teridentifikasi sebagai *E. sakazakii* namun dengan menggunakan API 20E ditemukan 15 dari 19 isolat tersebut teridentifikasi sebagai *E. sakazakii*.

Klasifikasi dengan menggunakan 4 reaksi biokimia Iversen menempatkan 15 dari 19 isolat ke dalam *Cronobacter* spp. Empat isolat lainnya memiliki karakter yang berbeda, sehingga untuk dapat mengelompokkan isolat lokal ke dalam *Cronobacter* spp. (*C. sakazakii* subsp. *sakazakii*, *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* dan *C. turicensis*) maka perlu dilakukan pengujian terhadap parameter uji pirolidonil.

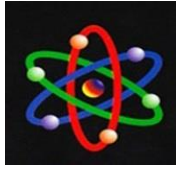
Isolat-isolat lokal terdiri atas 16 biotipe berdasarkan sifat biokimianya. Parameter yang digunakan dalam proses biotipe ini adalah 10 dari 19 uji biokimia pada RapID onE.

UCAPAN TERIMA KASIH

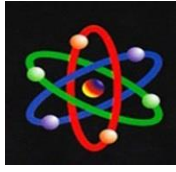
Penulis mengucapkan terima kasih kepada SEAFast Center atas pendanaan penelitian ini dan kepada Sri Hestuningsih, Yuliasri Ramadhani Meutia, Desty Gitaprawati dan Fransisca Wanny Hamdani atas penyediaan isolat yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Acker, J. Van, Smet, F. De, Muyltermans, G., Naessens, A., Lauwers, S., Muyltermans, T. a N., ... Smet, F. D. E. (2001). Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated



- with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula, *39*(1), 7–12.
<http://doi.org/10.1128/JCM.39.1.293>
- Chagla, A. H., Borczyk, A. A., Aldom, J. E., Rosa, S. D., & Cole, D. D. (1993). Evaluation of the L-Pyrrolidonyl-p-Naphthylamide Hydrolysis Test for the Differentiation of Members of the Families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae, *31*(7), 1946–1948.
- Dewanti-hariyadi, R., Nuraida, L., Gitapratwi, D., Immaningsih, N., & Hariyadi, P. (2009). editor: A / ERFR / T CURRENT ISSUES AND. In R. Dewanti-hariyadi, L. Nuraida, D. Gitapratwi, N. Immaningsih, & P. Hariyadi (Eds.), *Current Issues and Challenges in Food Safety: Science-based approach for food safety management* (pp. 281–286). Southeast Asian Food & Agricultural Science & Technology (SEAFAST) Center.
- Estuningsih, S., Holtkötter, C., Hassan, A., Schneider, Ö., & Usleber, E. (2006). Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *Journal of Food Protection*, *69*(12), 3013–3017.
- Farmer, J. J., Asbury, M. a., Hickman, F. W., & Brenner, D. J. (1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *30*(3), 569–584.
<http://doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
- Gitapratwi, D. (2011). *Isolasi dan Keragaman Genetika Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) dari Perangkat terkait persiapan susu formula, susu formula dan makanan kering lainnya*. Institut Pertanian Bogor.
- Gitapratwi, D., Dewanti-Hariyadi, R., & Hidayat, S. H. (2012). Genetic relatedness of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from dried food products in Indonesia. *International Food Research Journal*, *19*(4), 1745–1749.
- Gökmen, M., & Kaan, K. (2010). Presence of *Enterobacter sakazakii* in Milk Powder, Whey Powder and White Cheese Produced in Konya Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-2801 Konya 'da Üretilen Süt Tozu, Peynir Altı Suyu Tozu ve Beyaz Peynirde *Enterobacter sakazakii* Varlığının Araştırılması, *16*, 163–166.
- Hamdani, F. W. (2012). *Evaluasi keragaman genetika isolate lokal Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) yang diperoleh dari produk pangan kering*. Institut Pertanian Bogor.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2007). Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazaki*). *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(11), 3814–3816.
<http://doi.org/10.1128/JCM.01026-07>
- Iversen, C., Waddington, M., Farmer, J., & Forsythe, S. (2006). The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiology*, *6*(1), 94.
<http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-94>



- Jaradat, Z. W., Ababneh, Q. O., Saadoun, I. M., Samara, N. A., & Rashdan, A. M. (2009). infant food , herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical , chromogenic assays , PCR and 16S rRNA sequencing, *11*, 1–11. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-225>
- Mutia, Y. R. (2008). *Enterobacter sakazakii* isolat susu formula dan makanan bayi : karakterisasi gen 16S rRNA dan perilaku bakteri pasca rekonstitusi. Institut Pertanian Bogor.
- Muytjens, H. L., Zanen, H. C., Sonderkamp, H. J., & Kollee, L. A. (1983). Analysis of Eight Cases of Neonatal Meningitis and Sepsis Due to *Enterobacter sakazakii*, *18*(1), 115–120.
- Nazarowec-White, M., & Farber, J. M. (1999). Phenotypic and genotypic typing of food and cl i n i c a I is0 I ates of En terobacter sakazakii, *48*(1 999), 559–567.
- Oonaka, K., Furuhashi, K., Hara, M., & Fukuyama, M. (2010). Powder Infant Formula Milk Contaminated with *Enterobacter sakazakii*, (11), 103–107.
- SEAFST (Southeast Asian Food & Agricultural Science & Technology) Center. (2011). *Surveilan Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) pada susu formula*. Bogor.
- Stephan, R., Van Trappen, S., Cleenwerck, I., Iversen, C., Joosten, H., De Vos, P., & Lehner, A. (2008). *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(1), 237–241. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65427-0>
- Yao, K., Zinzendorf, N. Y., Bohoua, G., Kouassi, K. A., Koua, A., Kouadio, L. K., ... Loukou, G. Y. (2012). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) and Other Enterobacteriaceae in Commercial Powdered Infant Formula in Abidjan , Ivory Coast, *2012*(June), 822–826. <http://doi.org/10.4236/fns.2012.36110>