

Deteksi *Mycobacterium Avium* Subspesies *Paratuberculosis* pada Susu Pasturisasi yang Dijual di Bogor

(DETECTION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* IN PASTEURIZED MILK SOLD IN BOGOR)

Widagdo Sri Nugroho¹, Mirnawati Sudarwanto², Denny Widaya Lukman²,
Surachmi Setyaningsih³, Ewald Usleber⁴

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.
Jl. Fauna No. 2 Karangmalang Yogyakarta, Telp. 0274 560866, email: weesnugroho@yahoo.com

²Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner

³Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor.

Jl. Agatis Kampus Dramaga, Bogor

⁴Professur für Milchwissenschaften Institut für Tierärztliches Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig Universität, Giessen, Germany.

ABSTRACT

Mycobacterium avium subspesies *paratuberculosis* (MAP) is a thermal tolerant bacteria. The presence of these bacteria in pasteurized dairy milk is associated with infectious bowel disease in human known as *Crohn's disease*. The aim of this study was to detect MAP in pasteurized dairy milk sold in Bogor. Forty two samples of plain flavoured milk (180–250 ml) from 7 producers were bought from supermarkets in Bogor. The presence of MAP was detected by isolation and conventional polymerase chain reaction (PCR) using IS 900 and F57. Bacterial isolation were done by Herrold's egg yolk medium with mycobactine J (HEYMj) and without mycobactin J (HEYM) and incubated at 37°C for 20 weeks. The DNA extraction of all pasteurized dairy milk samples were conducted by DNeasy® Tissue Kit. **Amplification conditions for PCR were:** 1 cycle at 94°C for 10 minutes, 40 cycles at 94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 3 minutes, and 1 cycle at 72°C for 7 minutes. After 20 weeks of incubation, there were no sign of MAP which grew in all isolation mediums. The PCR IS 900 and F57 did not detect the DNA band of the target. In the conclusion, there was no MAP detected in pasteurized dairy milk sold in Bogor.

Key words: *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis*, pasteurized, dairy milk

PENDAHULUAN

Paratuberkulosis atau dikenal juga sebagai *Johne's disease* (JD) adalah penyakit radang granulomatosa kronis saluran pencernaan pada ruminansia yang disebabkan oleh *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* (MAP). Bakteri ini termasuk Gram positif dengan bentuk batang berukuran 0,2-0,7 X 1-10 µm, non motil, tahan asam, alkohol dan panas. Suhu pertumbuhan 25 – 45 °C, tumbuh lambat 4 - 24 minggu (Holt *et al.*, 1994; SCAHAW, 2000; Sung dan Collins, 2003). Keberadaan MAP dalam susu disebabkan cemaran dari tinja hewan penderita pada saat pemerahan atau pun diduga melalui sistem getah bening (Sweeney *et al.*, 1992). Infeksi bakteri tersebut pada peternakan sapi perah dan susu yang dihasilkan tercatat

cukup tinggi di beberapa negara seperti di Amerika Serikat, Inggris, Australia, dan Selandia Baru.

Penelitian tentang MAP di Inggris yang dilakukan selama tahun 1950, mengambil contoh sapi-sapi yang disembelih di rumah pematangan hewan (RPH) memperlihatkan prevalensi MAP mencapai 11-17%. Penelitian sejenis yang dilakukan di Denmark tahun 1965 menunjukkan prevalensi JD sebesar 2,3%. Prevalensi JD di Denmark cenderung meningkat mencapai 9,8% pada tahun 1972. Di Belgia, berdasarkan analisis ELISA terhadap 300 contoh serum sapi mengindikasikan 12% terinfeksi MAP, sedangkan di Spanyol teridentifikasi 67% sapi di peternakan terinfeksi. Pada tahun 1980, survei nasional di Amerika Serikat dengan metode isolasi bakteri diketahui 1,6% dari 7000

ekor sapi telah terinfeksi MAP (SCAHAW, 2000). Cemaran pada susu segar juga terdeteksi cukup sering pada sapi yang menderita JD secara klinis mau pun sub klinis (Grant *et al.*, 1998; Pillai dan Jayarao, 2002).

Bakteri MAP tahan panas. Hal ini terbukti dengan ditemukannya bakteri tersebut di dalam beberapa produk susu pasteurisasi di berbagai negara. Millar *et al.*, (1996) dengan metode PCR mendeteksi keberadaan MAP pada susu sapi pasteurisasi yang dijual di supermarket di Inggris dan Wales. Hasil pengujian tersebut memperlihatkan 7% dari 312 contoh susu pasteurisasi mengandung MAP. Survei yang dilakukan oleh *Advisory Committee on the Microbiology Safety Food* pada berbagai produk susu di Inggris menunjukkan hasil 2% (4/201) contoh susu mentah tercemar MAP sedangkan pada susu pasteurisasi 2,1% (10/476), susu skim 1,4% (2/140) dan tidak ditemukan pada susu *ultra heat treatment* (Griffiths, 2003). Grant *et al.*, (2002a) mendeteksi MAP dari 19 contoh susu segar dan 67 contoh susu pasteurisasi dari total 241 contoh (segar dan pasteurisasi).

Pasteurisasi *high temperature short time* (HTST) yang dilakukan perusahaan komersial hanya sedikit mempengaruhi daya tahan MAP yang mencemari bahan baku secara alami (Grant *et al.*, 2002b). Kenyataan ini menguatkan dugaan bahwa susu berperan dalam penularan *Crohn* (CD) yaitu penyakit radang pencernaan bagian bawah pada manusia. Dugaan tersebut juga dikuatkan dengan ditemukannya MAP strain sapi yang diisolasi dari penderita CD di Australia (Whittington *et al.*, 2000).

Di Indonesia saat ini telah banyak beredar susu pasteurisasi baik yang dibuat oleh perusahaan maupun usaha kecil. Cemaran MAP pada bahan baku susu segar yang berasal dari peternakan lokal hingga saat ini belum diketahui statusnya. Data terbaru tentang MAP di Indonesia adalah diperolehnya reaksi seropositif pada beberapa sapi perah di wilayah Jawa Tengah dan Jawa Barat pada tahun 2007-2008 (Adji, 2008). Informasi tersebut perlu mendapat perhatian, khususnya potensi MAP sebagai penyebab CD pada manusia. Sifat perkembangan penyakit yang perlahan menyebabkan sulitnya mendeteksi kasus pada awal infeksi sedangkan gejala klinik penyakit ini baru tampak 5-10 tahun berikutnya. Hal tersebut sangat merugikan kesehatan masyarakat karena penyakit CD mengurangi tingkat produktivitas manusia pada umur remaja atau dewasa.

Penelitian mengenai bakteri MAP pada susu formula di Indonesia pernah dilakukan dan ditemukan jejak keberadaan MAP dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) *nested* dengan menggunakan primer F57 (Nugroho *et al.*, 2008a) walau pun tidak terdeteksi dengan primer IS900 (Nugroho *et al.*, 2008b). Pemanasan pada pasteurisasi LTLT, HTST, mau pun UHT relatif rendah suhunya, dibandingkan dengan suhu pembuatan susu bubuk, sehingga kemungkinan MAP dapat bertahan dalam susu pasteurisasi lebih besar. Informasi ini perlu ditindaklanjuti dengan meneliti keberadaan bakteri MAP pada susu pasteurisasi yang dijual di Indonesia khususnya yang ditujukan untuk anak-anak.

Kajian ini dilakukan untuk mendeteksi bakteri MAP pada susu pasteurisasi di Bogor sebagai langkah awal mendapatkan data keberadaan MAP di Indonesia. Ketersediaan data dan informasi bakteri MAP pada susu pasteurisasi ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi pemerintah, swasta, dan peternak untuk mengantisipasi keberadaan MAP pada semua rantai produksi susu pasteurisasi.

BAHAN DAN METODE

Pengumpulan Contoh

Empat puluh dua kemasan susu pasteurisasi (180-250 ml/kemasan) diperoleh selama bulan September-Oktober 2007. Contoh berupa susu pasteurisasi rasa murni (*plain flavour*) yang dijual untuk anak-anak, diproduksi oleh 7 produsen yang berbeda (A-G). Contoh susu berasal dari 5 produsen dalam negeri dan 2 dari luar negeri. Seluruh contoh dibeli di pasar swalayan di wilayah Bogor. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Terpadu, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Uji Storch

Uji *storch* dilakukan untuk memastikan susu sudah dipasteurisasi dengan sempurna. Sebanyak 5 ml contoh dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditetesi 2 tetes larutan HCl parafenilindiamin 2% selanjutnya ditambahkan 4 tetes hidrogen peroksida. Susu yang belum dipasteurisasi akan berwarna biru sedangkan yang sudah dipasteurisasi tetap berwarna putih.

Penyiapan Contoh

Seratus mililiter dari masing-masing contoh dituang ke dalam 2 buah tabung gelas sentrifus steril (ukuran 50 ml) dan disentrifus (Serovall Super T21, USA) pada kecepatan 2500X g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang sedangkan pelet pada masing-masing tabung diresuspensi dengan 1 ml akuades steril dan selanjutnya disatukan (dari asal contoh yang sama) dan diaduk hingga rata, 1 ml larutan diambil dan ditempatkan pada tabung eppendorf 1,5 ml untuk analisis PCR sedangkan sisanya digunakan untuk analisis biakan.

Dekontaminasi dan Inokulasi Contoh Susu Pasteurisasi

Satu ml suspensi contoh dipindahkan ke dalam tabung gelas steril dan ditambahkan 10 ml 0,75% *hexadecilpyridinium chloride* (HPC) (Biomedical, USA) dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 jam. Suspensi disentrifus pada kecepatan 2500X g selama 15 menit, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 750 µl sterile PBS (Invitrogen, New Zealand). Sebanyak 750 µl diinokulasikan ke dalam 2 tabung HEYM yang diperkaya *mycobactin J* (HEYMj) dan 1 tabung HEYM tanpa *mycobactin J* (HEYM) (Becton Dickinson, USA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 minggu untuk mengetahui adanya pertumbuhan bakteri dalam media. Pengamatan dilakukan setiap minggu dan koloni terduga MAP yang tumbuh dibuat preparat dan diwarnai dengan *Ziehl-Nielsen* (ZN) untuk konfirmasi spesies.

Deteksi MAP dengan Analisis PCR IS900 dan F57

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil 500 µl suspensi yang disiapkan dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml kemudian disentrifus pada kecepatan 10.000 X g selama 30 menit. Supernatan dibuang dan 400 ml larutan penyangga TE *lysis* (20 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; Triton 100 1,2%; pH 8,0) ditambahkan pada pelet dan divorteks hingga homogen. Suspensi selanjutnya dimasukkan ke dalam freezer -80°C selama 5 menit dan segera dipindahkan ke dalam penangas air suhu 95°C selama 1 menit, tahap ini diulang satu kali kemudian suspensi diinkubasi di dalam penangas air suhu 80°C selama 20 menit. Suspensi didinginkan pada suhu 4°C dan ditambahkan 35 µl proteinase K dan 400 µl AL *Lysis buffer* (Qiagen, Germany) setelah

dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama satu malam. Suspensi kemudian diekstraksi menggunakan DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Germany) sesuai petunjuk dari perusahaan.

Metode PCR konvensional dengan primer IS900 dilakukan menggunakan primer TJ1/TJ2 (Bull *et al.*, 2003) sedangkan primer F57 menggunakan F57/R57 (Vansnick *et al.*, 2004). Amplifikasi kedua primer dilakukan dengan formulasi yang sama. Formula amplifikasi PCR sebanyak 50 µl larutan reaksi yang tersusun dari GeneAmp 10x PCR Gold Buffer (150 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8.0) (Applied Biosystem, Germany), 3,0 µl MgCl₂ (25 mM) (Applied Biosystem, Germany), 1,5 µl masing-masing primers (10 pmol/µl), 1,5 µl dNTP-mix (10 mmol/ µl) (Bioron, Germany) 0,25 µl AmpliTaq Gold® polymerase (5 U/µl) (Applied Biosystem, Germany), 32,25 µl aquades steril, dan ditambahkan 5,0 µl DNA template. Kondisi amplifikasi PCR yang digunakan adalah 1 siklus pada 94°C selama 10 menit kemudian 40 siklus pada 94°C selama 1 menit, 58°C selama 1 menit, dan 72°C selama 3 menit, dan dilanjutkan dengan 1 siklus pada 72°C selama 7 menit. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystem, Singapore).

Produk PCR (amplikon) (13 µl) dicampur dengan 2 µl *loading dye solution* (MBI Fermentas, Germany) dan sebagai marker digunakan 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas, Germany) selanjutnya diseparasi menggunakan 2% *gel agarose electroforesis* (Biozym, Germany) pada tegangan 120 volt di dalam larutan 1x TAE buffer (0.04 mol/l Tris, 0.001 mol/l EDTA, pH 7.8). Setelah dielektroforesis selama 50 menit, gel agarose direndam dalam larutan pewarna *ethidium bromide* 5 µl/ml (Sigma, Germany) selama 5 menit, dan gambar didokumentasikan dengan menggunakan UV (245 nm) trans-illuminator (Vilber Lourmat, France).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seluruh contoh susu yang berjumlah 42 telah dipasteurisasi dengan sempurna yang dibuktikan dengan warna putih yang tetap pada uji *storch*. Rata-rata *total plate count* (TPC) bakteri aerobik dalam seluruh susu pasteurisasi contoh adalah $7,4 \times 10^3$ *colony forming unit* (CFU)/ml jumlah ini masih di bawah standar yang ditetapkan dalam SNI nomor 01-6366-2000

tentang Batas Residu dan Cemaran Mikroba yaitu $\leq 3 \times 10^4$ CFU/ml. Rata-rata TPC bakteri aerobik susu pasteurisasi dari produsen F dan G yang merupakan produsen kecil/menengah masih melebihi standar yang ditentukan.

Inokulasi contoh susu untuk mengisolasi MAP mendapatkan 1 isolat yang tumbuh pada tabung HEYMj. Pemeriksaan mikroskopik terhadap preparat ulas bakteri dengan pewarnaan tahan asam ZN membuktikan bahwa isolat tersebut bukan *Mycobacterium sp.* Pada uji PCR IS900 dan F57 dari seluruh contoh juga tidak menunjukkan adanya pita DNA target. Hasil seluruh pengujian disajikan dalam Tabel 1.

Rendahnya TPC bakteri aerobik menunjukkan tingkat efektifitas pasteurisasi yang baik telah dilakukan produsen besar/pabrikan (contoh A-E) sedangkan 2 produsen kecil/menengah (F dan G) masih sangat kurang. Hal ini terlihat pada jumlah bakteri aerobik yang terkandung di dalamnya. Pengujian TPC terhadap contoh susu dilakukan dengan rentang waktu 1-3 dari tanggal produksi dan masih jauh dari tanggal kedaluwarsa masing-masing contoh. Kondisi susu pasteurisasi yang tidak tercemar MAP ini dapat terjadi karena efektifitas pasteurisasi yang diterapkan oleh produsen dan atau bahan baku susu segar yang bebas dari MAP.

Hasil penelitian ini berbeda dengan temuan dari beberapa penelitian di luar negeri yang banyak menemukan MAP pada susu pasteurisasi. Pasteurisasi merupakan suatu metode pemanasan yang cukup efektif untuk

mematikan bakteri *Mycobacterium bovis* dalam susu. Namun, ternyata metode tersebut masih belum efektif untuk mematikan MAP (Chiodini dan Hermon-Taylor, 1993). Metode pasteurisasi secara HTST dan LTLT mampu mengurangi 4-50% MAP (Grant *et al.*, 1996). Hal tersebut memperlihatkan bahwa bakteri MAP masih mampu bertahan dalam susu yang telah dipasteurisasi. Pada pasteurisasi skala industri, bakteri MAP yang secara alami mencemari bahan baku masih dapat dideteksi sekitar 6,9% dengan metode PCR dan isolasi (Grant *et al.*, 2002b). Hasil penelitian Millar *et al.*, (1996) memperlihatkan bahwa susu pasteurisasi yang dijual di supermarket di Inggris dan Wales masih mengandung bakteri MAP. Beberapa penelitian lain juga melaporkan keberadaan MAP pada produk susu segar mau pun susu pasteurisasi baik dengan metode PCR maupun isolasi seperti di Inggris (Grant *et al.*, 2002a) di Irlandia (O'Reilly *et al.*, 2004), di Ceska (Ayele *et al.*, 2005) sedangkan penelitian Donaghy *et al.*, (2004) mendapati bakteri MAP pada keju *cheddar*.

Metode HTST dilaporkan oleh Stabel *et al.*, (1997) efektif mematikan MAP, namun Chiodini dan Hermon-Taylor (1993) memperlihatkan daya tahan yang berbeda antara MAP isolat sapi dan manusia terhadap metode pasteurisasi LTLT (63°C, 30 menit) mau pun HTST (72°C, 15 detik). Pada metode LTLT, MAP isolat sapi dapat dimatikan hingga 90-95% dan dengan HTST mencapai > 95% sedangkan isolat manusia hanya 60-80% saja yang mati pada LTLT namun dengan HTST justru lebih tahan

Tabel 1 Hasil pengujian MAP pada susu pasteurisasi di wilayah Bogor

NO	Produsen	Rata-rata TPC (CFU/ml)	Isolasi bakteri (Σ sampel)		AFB		PCR IS900		PCRF57	
			+	-	+	-	+	-	+	-
1	A	1.7×10^3	0	6	-	-	0	6	0	6
2	B	2.5×10^3	0	6	-	-	0	6	0	6
3	C	4.3×10^3	1	5	0	1	0	6	0	6
4	D	8.3×10^2	0	6	-	-	0	6	0	6
5	E	1.0×10^3	0	6	-	-	0	6	0	6
6	F	7.57×10^4	0	6	-	-	0	6	0	6
7	G	TDD(> 1.0×10^6)	0	6	-	-	0	6	0	6
Total		7.4×10^3	1	41	0	1	0	42	0	42

Keterangan: TPC: total plate count, CFU: Colony Forming Unit, TDD: tidak dapat dihitung, AFB: acid fast bacilli (pewarnaan tahan asam Ziehl-Neelsen)

dan meningkat hingga 25-31% setelah fase pendinginan 4°C. Jumlah bakteri dalam susu juga mempengaruhi efektifitas pasturisasi. Penelitian Grant *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa cemaran MAP sebanyak 10^4 - 10^7 CFU/ml sebelum pasteurisasi mampu bertahan hingga 50% pada LTLT dan 58% pada HTST. Pendapat ini sejalan dengan temuan Sung dan Collins (1998) yang melaporkan bahwa bakteri MAP masih ditemukan pada susu pasteurisasi menggunakan metode HTST, apabila bahan baku susu tercemar lebih dari 10^4 CFU/ml. Sung dan Collins (1998) juga melaporkan bahwa *D values* (waktu yang dibutuhkan untuk menurunkan konsentrasi bakteri sebanyak 1 log10) pada suhu pasteurisasi 62°C yaitu selama 228,8 detik; suhu 65°C selama 47,8 detik, suhu 68°C selama 21,8 detik dan pada suhu 71°C selama 11,67 detik. Efektivitas pasteurisasi juga ditunjukkan oleh McDonald *et al.*, (2005) yang mengkombinasikan aliran turbulen pada proses pasteurisasi berlanjut yaitu pada suhu 72°C selama 15 detik dan dilanjutkan 78°C selama 25 detik, perlakuan itu mampu menurunkan MAP hingga 10^6 CFU. Teknik lain pengolahan susu yang dapat menginaktivasi MAP adalah menggunakan tekanan hidrostatik tinggi 500 MPa pada suhu sedang. Teknik ini mampu mengurangi MAP hingga 10^4 CFU/ml (Lopez-Pedemonte *et al.*, 2006).

Penelitian Sung *et al.*, (2004) mengindikasikan bahwa kemampuan tahan panas bakteri MAP dikendalikan oleh tiga protein yaitu GroES *heat shock protein*, *antigen 85 complex B*, dan *alpha antigen*. Antigen alfa dan antigen 85kompleks B keduanya merupakan *trehalose mycolyltransferase* yang terlibat dalam pembentukan dinding sel bakteri. Protein GroES mampu memperbaiki dinding sel bakteri yang mengalami pelipatan atau mengalami denaturasi akibat suhu tinggi, protein tersebut juga dikenal sebagai *heat shock protein*.

Media HEYM merupakan media standar yang digunakan untuk isolasi MAP. Penggunaan secara paralel HEYM yang diperkaya *mycobactin J* dan yang tidak diperkaya *mycobactin J* merupakan metode untuk seleksi yang didasarkan pada karakter ketergantungan MAP pada *mycobactin*. Sifat fenotip ini dapat digunakan untuk membedakan MAP dengan bakteri dari golongan *Mycobacteriaceae* lainnya (JIC, 2006). Ketidakmampuan MAP mensintesis senyawa *siderophor* diakibatkan oleh kondisi represif dari lingkungan yang mempengaruhi fenotipnya dan bukan faktor genetik.

MAP sangat tergantung pada *mycobactin J* dari luar ternyata memiliki kemampuan mensintesis senyawa tersebut dalam jumlah sangat sedikit sehingga tidak mencukupi kebutuhannya. Pada kondisi nutrisi dan lingkungan yang baik dalam waktu lama, seperti biakan laboratorium, sifat ketergantungan tersebut akan hilang seperti yang diperlihatkan pada *M. avium* subspecies *avium*. *Mycobactin* merupakan senyawa yang secara alami dihasilkan oleh *Mycobacterium* terutama *M. phlei* yang membantu MAP mengabsorpsi zat besi (Fe) untuk kebutuhan pertumbuhannya (Barclay dan Ratledge, 1983).

Metode PCR menggunakan sekuen IS900 sebagai primer MAP dilaporkan oleh Green *et al.*, (1989) sangat membantu diagnosis MAP dengan lebih akurat bahkan dapat membedakannya dengan subspecies lain dari *M. avium complex* dan *M. silvaticum*. Beberapa peneliti dengan rancangan primer yang mengambil sekuen tertentu dari IS900 masih mendapatkan reaksi positif palsu. Bull *et al.*, (2003) memperlihatkan sekuen IS900 (primer TJ1-4) memiliki tingkat akurasi yang cukup tinggi sehingga pemilihan sekuen dalam rancangan primer IS900 sangat mempengaruhi hasil. Cocito *et al.*, (1994) menggunakan primer yang berasal dari *cloning* vektor transposon DNA MAP dan dinamakan primer F57. Primer ini dikembangkan oleh Vansnick *et al.*, (2004) dan berhasil mendapatkan kinerja yang sangat baik dengan mampu mendeteksi MAP hingga 1 CFU/PCR. Tasara dan Stephan (2005) menguji primer ini dengan metode *real-time* PCR dan mampu mendeteksi MAP di dalam susu yang dikontaminasi dengan MAP sebanyak 10 sel/ml. Kinerja primer F57 sangat baik sehingga direkomendasikan sebagai metode rutin pengujian MAP pada susu dan akan lebih akurat apabila diparalel dengan penggunaan primer IS900.

Penelitian ini memperlihatkan bahwa produk susu pasteurisasi yang dijual di Bogor tidak terkontaminasi bakteri *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* baik dideteksi dengan PCR menggunakan primer IS900 dan F57 mau pun isolasi dengan HEYMj. Meskipun demikian dengan temuan jejak DNA MAP pada susu formula lanjutan yang dijual di Bogor, patut untuk selalu mewaspadai keberadaan bakteri ini pada susu segar maupun produk olahannya.

SIMPULAN DAN SARAN

Tidak ditemukan keberadaan bakteri *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* pada susu pasturisasi yang dijual di Bogor.

Perlu dilakukan pengujian dengan contoh yang lebih banyak dan rutin untuk menjamin keamanan pangan bagi konsumen khususnya anak-anak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional 2008 yang membiayai pendidikan pascasarjana bagi penulis pertama serta kepada *Deutsche Akademische Austauschdienst* (DAAD) 2006 yang telah membantu membiayai penelitian ini melalui program *sandwich*.

DAFTAR PUSTAKA

- [JIC] Johnes's Information Center. 2006. School of Veterinary Medicine University of Wisconsin, <http://www.johnes.org/glossary.html> [11 Maret 2006 13.20]
- Adji RS. 2008. Deteksi *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* pada sapi perah di Kabupaten Bandung dan Banyumas. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* Cultured from Locally and Commercially Pasteurized Cow's Milk in Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 71:1210-1214.
- Barclay R., Ratledge C. 1983. Iron-Binding Compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and Mycobactin-Dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J Bacteriol* 3:1138-1146.
- Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J. 2003. Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease. *J Clin Microbiol* 41: 2915-2923.
- Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. 1993. The Thermal Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in Raw Milk under Conditions Stimulating Pasteurization. *J Vet Diagn. Invest.* 5:629-631.
- Cocito C, Gillot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7:328-345.
- Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* During Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Appl Environ Microbiol* 8:4899-4905.
- Grant IR, Ball HJ, Neill SD, Rowe MT. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Cows' Milk at Pasteurization Temperatures. *Appl and Environ Microbiol* 62:631-636.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. 1998. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from Milk by Immunomagnetic Separation. *Appl Environ Microbiol* 64:3153-3158.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. 2002a. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows Milk from Approved Dairy Processing Establishments in The United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 68:2428-2435.
- Grant IR, Hitchings EI, McCartney A, Ferguson F, Rowe MT. 2002b. Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization on The Viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in Naturally Infected Cows' Milk. *Appl and Environ Microbiol* 68:602-607.
- Green EP, Tizard MLV, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, McFadden JJ, Hermon-Taylor J. 1989. Sequence and characteristics of IS900, an Insertion Element Identified in a Human Crohn's Disease Isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 17:9063-9073.
- Griffiths M. 2003. *Mycobacterium paratuberculosis*. Di dalam: Blackburn CW. & McClure PJ, editor. *Food-borne Pathogens*, Ed ke-1. North America: Woodhead and CRC Pr. Pp. 489-500.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed ke-9. Maryland USA, Williams & Wilkins. Pp. 597.

- McDonald WL, O'Riley KJ, Schroen CJ, Codron RJ. 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Appl Environ Microbiol* 71:1785-1789.
- Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey J, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J. 1996. IS 900 PCR to Detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Retail Supplies of Whole Pasteurised Cows' Milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3446-3452.
- Nugroho WS, Sudarwanto M, Lukman DW, Naim R, Setyaningsih S, Hassan AA, Usleber E. 2008a. Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Pada Susu Formula Lanjutan di Bogor. *J Teknol Industr Pangan* 9:19-24.
- Nugroho WS, Sudarwanto M, Lukman DW, Naim R, Hassan AA, Usleber E. 2008b. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in formula milk in Bogor using PCR IS900. *Med J Indon.* 17:183-187.
- O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant IR, Donaghy J, Rowe MT, O'Mahony P. 2004. Surveillance of Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Irish Liquid-Milk Pasteurization Plants to Determine The Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 70:5138-5144.
- Lopez-Pedemonte T, Sevilla I, Garrido JM, Aduriz G, Guamis B, Juste RA, Roig-Sagues AX. 2006. Inactivation of *Mycobacterium* subsp. *paratuberculosis* in Cow's Milk by Means of High Hydrostatic Pressure at Mild Temperature. *Appl Environ Microbiol* 72:4446-4449.
- Pillai SR, Jayarao BM. 2002. Application of IS900 PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Directly from Raw Milk. *J Dairy Sci* 85:1052-1057.
- [SCAHAW] Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. 2000. Possible Links Between Crohn's Disease and Paratuberculosis., European Commission, Directorate-General Health & Consumer Protection.
- Stabel JR, Steadham EM, Bolin CA. 1997. Heat Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Raw Milk: Are Current Pasteurization Conditions Effective? *Appl Environ Microbiol* 63: 4975-4977.
- Sung N, Collins MT. 1998. Thermal Tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 999-1005.
- Sung N, Collins MT. 2003. Variation in Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to Acid Environments as a Function of Culture Medium. *Appl Environ Microbiol* 69: 6833-6840.
- Sung N, Takayama K, Collins MT. 2004. Possible Association of GroES and Antigen 85 Protein with Heat Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 70:1688-1697.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* Cultured from Milk and Supramammary Lymph Nodes. of Infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 30:166-171.
- Tasara T, Stephan R. 2005. Development of an F 57 Sequence-based Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* *Appl Environ Microbiol.* 10:5957-5968.
- Vansnick E *et al.* 2004. Newly developed primers for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 100:197-204.
- Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. 2000. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism and IS1311 Polymorphism Analyses of Isolates from Animals and Human in Australia. *J Clin Microbiol* 38:3240-3248.