

PENGARUH BERBAGAI KONDISI PREPARASI DAN PENYIMPANAN SUSU FORMULA PADA PERTUMBUHAN SPORA *Bacillus cereus* DAN *Clostridium perfringens*

[The growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores under a variety of preparation and storage condition]

Maya Purwanti¹⁾, Mirnawati Sudarwanto²⁾, Winiati P. Rahayu³⁾, dan A. Winny Sanjaya²⁾

¹⁾Jurusan Penyuluhan Peternakan, Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian Bogor, ²⁾Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, dan ³⁾Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Diterima 23 Juli 2008 / Disetujui 14 Juni 2009

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the ability of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores to survived in different preparation temperature (25, 35, and 70°C for *B. cereus* and 25, 45, 70°C for *C. perfringens*) and modified storage condition (with 50 and 75% humidity; opened, closed and opened twice a day during period of observation) of powdered milk formula. The spores of *B. cereus* ATCC 13061 and *C. perfringens* CP-1 artificially contaminated to the milk formula. Results showed that *B. cereus* and *C. perfringens* spores were germinated and growth in reconstituted milk formula. Bacteria population increased ≥ 1 log within 3 hours at room temperature (28-29°C). The spores of both bacteria survived from dry condition of powdered milk formula, like when aw of the formulas increased cause of storage condition.

Key words: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, powdered milk formula, preparation temperature, storage condition.

PENDAHULUAN

Air susu ibu adalah makanan yang terbaik bagi bayi, namun karena satu dan lain hal, ibu tidak mampu menyusui bayinya, sehingga membutuhkan bantuan susu formula. Susu formula yang diperdagangkan di Indonesia umumnya dalam bentuk formula bubuk.

Bentuk bubuk tidak memerlukan cara penyimpanan yang khusus, setelah kemasan dibuka, susu formula cukup disimpan pada tempat yang kering dan tertutup rapat. Pelarutannya kembali, cukup ditambahkan air matang dengan suhu minimal 70°C, maka susu formula sudah bisa dikonsumsi (Codex Alimentarius Commission, 2007). Anjuran tersebut tidak sepenuhnya dipatuhi oleh para ibu dalam melarutkan susu formula. Perlakuan yang tidak semestinya pada penyimpanan dan preparasi, menjadikan susu formula sebagai pangan yang berisiko tinggi karena kepekaan bayi terhadap bakteri enterik patogen dan respon yang berlebihan terhadap toksin.

Ada sejumlah penyakit yang dikaitkan dengan susu formula bubuk sebagai wahana infeksinya (Louie, 1993; Gericke dan Thurn, 1994). Sebuah kejadian luar biasa akibat pangan yang diderita 35 neonatus di Chile, diduga berhubungan dengan *B. cereus* dalam susu bubuk dengan level 50-200 spora/g (Cohen *et al.*, 1984).

Kepekaan bayi terhadap jumlah kecil mikroba patogen kemungkinan berhubungan dengan sistem imun yang belum berkembang (Anderton, 1993). Keberadaan *B. cereus* enterogenik dalam makanan bayi yang didistribusikan

di 17 negara telah dilaporkan oleh Becker *et al.* (1994) dengan level antara 0.3-600 sel/g. Efuntoyee dan Adetosoye (2004) melaporkan bahwa 3% kasus diare sporadik pada balita Nigeria disebabkan oleh *Clostridium* spp., dimana 72% diantaranya adalah *C. perfringens* tipe A.

B. cereus dan *C. perfringens* adalah bakteri Gram positif bentuk batang, termasuk kelompok pembentuk endospora yang menjadi penyebab terjadinya keracunan pangan (Todar, 2005). Penyakit terjadi seiring dengan termakannya sejumlah besar organisme ($>10^6$ - 10^7 sel) tumbuh di dalam usus halus, menghasilkan enterotoksin dan menyebabkan diare (Labbe, 1989; Brynestad dan Granum, 2002).

B. cereus adalah bakteri aerob, mampu tumbuh pada suhu 4-50°C, dengan suhu optimum 30-40°C (ICMSF, 1996). Waktu generasi pada suhu 30°C adalah 26-57 menit, dan pada suhu 35°C adalah 18-27 menit (Kramer dan Gilbert, 1989). *C. perfringens* adalah bakteri anaerob, dengan suhu untuk pertumbuhan sel vegetatif serta germinasi spora dan tumbuh kembali bervariasi antara 10-52°C, dengan suhu optimum sekitar 45°C. Pada kondisi optimum, multiplikasi sel dapat sangat cepat, kira-kira 9 menit (Ray, 2001).

Sampai sejauh ini, informasi tentang keberadaan *B. cereus* dan *C. perfringens* pada kasus keracunan pangan di Indonesia masih jarang dilaporkan. Tujuan dilakukannya kajian ini adalah untuk melihat: (1) pengaruh suhu awal preparasi dan waktu pengamatan terhadap kemampuan bertahan dan germinasi spora *B. cereus* dan *C. perfringens*

dalam susu formula, dan (2) pengaruh kelembaban, cara dan waktu penyimpanan terhadap kemampuan bertahan spora *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam susu formula bubuk.

METODOLOGI

Produksi spora *B. cereus* dan *C. perfringens* (Rhodehamel dan Harmon, 1998a+b)

Sel vegetatif *B. cereus* (ATCC 13061, koleksi Balai Besar Penelitian Veteriner) diinokulasi ke dalam *brain hearth infusion* (Difco) medium dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Sebanyak 0.1 ml suspensi kemudian digoreskan diatas nutrient agar yang mengandung $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (50 µg/ml). Spora dipanen setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 72-76 jam dengan cara menggenangi permukaan setiap cawan dengan 5 ml air deion steril, permukaan media digosok dengan batang kaca steril untuk melepaskan spora dan sel yang tidak bersporulasi. Suspensi kemudian disaring dengan *glass wool* dan disentrifus (2600 x g, 20 menit, 21°C). Pencucian dilakukan berulang sampai semua spora terlepas dari sel vegetatifnya (Rhodehamel dan Harmon, 1998a). Suspensi (50-100 ml) disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk kajian pengaruh suhu preparasi susu formula.

Isolat vegetatif *C. perfringens* (CP 1, koleksi Dept. Mikrobiologi FKH-UGM) sebanyak 6 ml diinokulasi ke dalam *fluid thyoglicollate medium* (Oxoid), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara anaerob. Kemudian 0.2 ml kultur diinokulasi ke dalam 10 ml *Duncan-Strong sporulation medium* (Oxoid, 1998), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (anaerob). Adanya spora dalam kultur dikonfirmasi dengan mikroskop (Rhodehamel dan Harmon, 1998b). Suspensi disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk kajian pengaruh suhu preparasi susu formula (SF).

Untuk keperluan kajian penyimpanan dalam SF bubuk, spora *B. cereus* dan *C. perfringens* masing-masing disimpan dalam vial 10 ml, dibekukan pada suhu -82°C selama 24 jam, kemudian dikering bekukan dengan menggunakan *freezer dryer* (Kinetics). Setelah kering, disimpan pada suhu -82°C sampai digunakan.

Kajian pengaruh suhu preparasi susu formula

Sebanyak masing-masing 20 gram susu formula (SF) dilarutkan dengan 180 ml aquadestilata steril dengan suhu pelarutan 70, 35, dan 25°C untuk susu formula A (SF-A), serta 70, 45, dan 25°C untuk susu formula B (SF-B). Perlakuan ketiga suhu tersebut dipilih dengan pertimbangan suhu 70°C adalah suhu pelarutan minimal yang disarankan oleh EFSA (2004), suhu 35 dan 45°C adalah rata-rata suhu optimal untuk pertumbuhan *B. cereus* dan *C. perfringens* (Jay, 2000), dan suhu 25°C adalah rata-rata suhu ruang di negara tropis.

Ke dalam larutan SF-A ditambahkan rata-rata 10^3 spora bakteri *B. cereus*/ml dan larutan SF-B ditambahkan

rata-rata 10^3 spora *C. perfringens*/ml. Dibuat pula larutan SF tanpa dikontaminasi, sebagai kontrol. Larutan SF-A dan SF-B diberi *heat shock* dalam penangas air (70°C, 15 menit) dengan tujuan untuk merangsang spora melakukan germinasi dan mematikan sel vegetatif yang ada di dalam SF bubuk, kemudian dibuat pengenceran seri. Pemeriksaan mikrobiologik dilakukan dengan menginokulasi 0.1 ml larutan SF-A dari pengenceran seri pada agar *mannitol yolk polymyxin* (Oxoid) dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 20-24 jam. Koloni dengan zona presipitasi warna eosin merah jambu-lavender dihitung. Sebanyak 0.1 ml larutan SF-B dari pengenceran seri diinokulasi pada agar *tryptose sulfite cycloserine* (Oxoid) yang diberi emulsi kuning telur (50%), diinkubasi secara anaerob pada suhu 35°C selama 20-24 jam. Dihitung lempeng yang mengandung koloni hitam dengan zona presipitasi.

Larutan SF-A dan SF-B selanjutnya disimpan dalam suhu ruangan. Pemeriksaan dilakukan setiap 1 jam sekali selama 4 jam berturut-turut. Waktu 4 jam adalah *hang time* yang direkomendasikan oleh EFSA (2004) untuk susu formula. Setiap perlakuan diulang 3 kali, dan dianalisis secara duplo.

Kajian pengaruh penyimpanan susu formula bubuk

Sebanyak rata-rata 10^3 spora kering beku *B. cereus* dan rata-rata 10^4 spora kering beku *C. perfringens* ditambahkan masing-masing ke dalam 700 g SF bubuk, selanjutnya diaduk dengan spatula steril sampai spora dan SF tercampur rata. SF yang sudah dikontaminasi, disimpan dalam stoples dengan ϕ 16 cm. Untuk kontrol, 100 g SF yang sudah dikontaminasi dikemas dalam kantong plastik dan ditutup rapat. SF bubuk selanjutnya mendapat perlakuan: (1) wadah dibuka, (2) wadah dibuka 2 kali sehari selama 2 menit, dan (3) wadah tertutup (kontrol). Seluruh SF kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu $\pm 27^\circ C$ dengan tingkat kelembaban nisbi <50% (A) dan >70% (B).

Kelembaban <50% merupakan gambaran kondisi ruangan yang kering, dan kelembaban >70% merupakan gambaran kondisi ruangan yang lembab. Untuk menciptakan ruangan dengan kelembaban <50% digunakan pendingin ruangan yang dihidupkan selama 24 jam, dan untuk menciptakan ruangan berkelembaban >70% digunakan air yang diletakkan di dasar inkubator. Setiap hari dicatat suhu dan kelembaban yang terbentuk dalam inkubator, dilakukan 2 kali yaitu pagi dan sore. Setiap perlakuan diulang 3 kali, dan dianalisis secara duplo.

Pemeriksaan mikrobiologik dilakukan setiap hari sampai hari ke-5 dengan cara dan media yang sama seperti pada kajian preparasi. Lama penyimpanan ditentukan 5 hari sesuai dengan masa konsumsi susu formula dengan berat 400 g yang sudah dibuka.

Sebanyak masing-masing 75 g SF bubuk dari masing-masing perlakuan diukur nilai aktivitas air (a_w) dengan menggunakan a_w -meter. Dicatat skala a_w dan suhunya. Nilai a_w yang didapat dikonversi ke nilai a_w pada suhu 25°C.

Analisis statistik

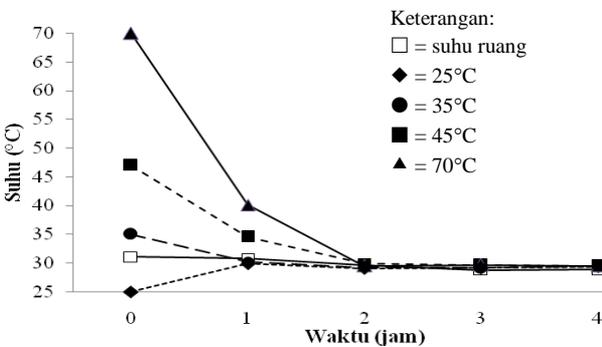
Untuk kajian preparasi SF, data yang diperoleh dianalisis dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah suhu awal yang digunakan dalam preparasi SF dan faktor kedua adalah waktu pengamatan. Untuk kajian penyimpanan SF bubuk, data yang diperoleh dianalisis dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan tiga faktor. Faktor pertama adalah cara penyimpanan, faktor kedua adalah kelembaban dan faktor ketiga adalah waktu penyimpanan.

Untuk melihat kecepatan pertambahan jumlah bakteri dalam preparasi SF, dihitung waktu generasinya. Data dan tampilan grafik diolah dengan menggunakan Microsoft Office Excel 2007 dan SPSS 15.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh suhu awal preparasi dan lama penyimpanan pada pertumbuhan spora *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam larutan susu formula

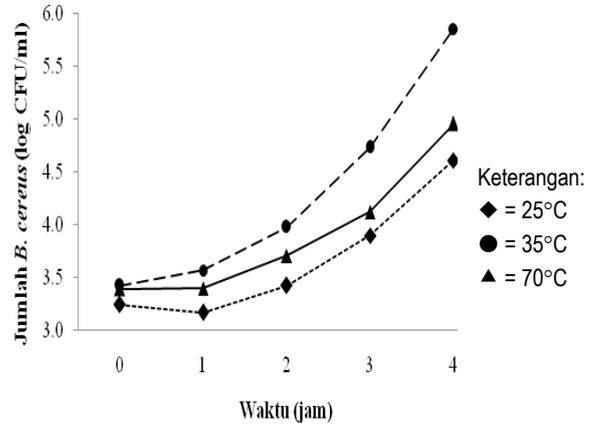
Pelarutan susu formula dengan menggunakan suhu 70°C, jika disimpan pada suhu ruang (27-30°C) dan wadah tertutup akan menjadi dingin (28-29°C) dalam waktu 2 jam. Jika pelarutan menggunakan suhu yang lebih rendah, kesesuaian suhu susu formula dengan suhu ruang akan dicapai dalam waktu yang lebih cepat (Gambar 1).



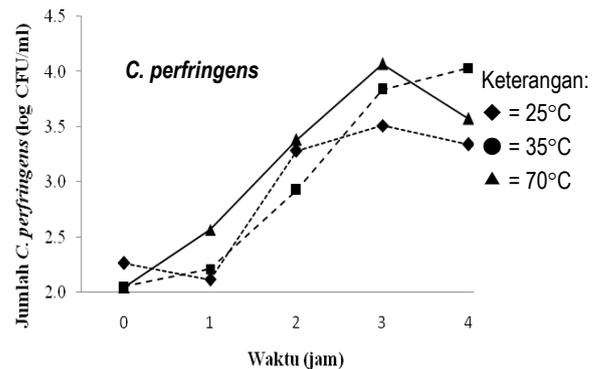
Gambar 1 Perubahan suhu larutan susu formula yang disimpan selama 4 jam pada suhu ruang

Dari hasil analisis diketahui bahwa suhu awal preparasi dan waktu penyimpanan di suhu ruang berpengaruh sangat nyata ($p < 0.01$) pada pertumbuhan spora *B. cereus*, sedangkan pada pertumbuhan spora *C. perfringens* yang berpengaruh nyata ($p < 0.05$) adalah waktu penyimpanan di suhu ruang. Suhu awal preparasi ternyata berhubungan sangat lemah terhadap pertumbuhan spora *B. cereus* ($r = 0.12$, $p > 0.01$) dan *C. perfringens* ($r = 0.07$, $p > 0.01$), sedangkan lama penyimpanan di suhu ruang ternyata berhubungan sangat kuat pada pertumbuhan spora *B. cereus* ($r = 0.74$, $p < 0.01$) dan *C. perfringens* ($r = 0.50$, $p < 0.01$) di dalam larutan susu formula. Penelitian Rowan *et al.*,

(1997) pada 100 merek susu bayi yang dipreparasi pada berbagai suhu juga menunjukkan hasil yang serupa. Gambaran pertumbuhan spora *B. cereus* dan *C. perfringens* masing-masing tersaji pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2 Pertumbuhan spora dan sel vegetatif *B. cereus* pada susu formula yang dipreparasi pada berbagai suhu yang disimpan selama 4 jam pada suhu ruang



Gambar 3 Pertumbuhan spora dan sel vegetative *C. perfringens* pada susu formula yang dipreparasi pada berbagai suhu yang disimpan selama 4 jam pada suhu ruang

Pada satu jam pertama, pertumbuhan spora *B. cereus* pada suhu 25°C dan 70°C serta spora *C. perfringens* pada suhu 25°C cenderung menurun (Gambar 2 dan 3), tetapi tidak ada perbedaan diantara perlakuan ($p > 0.05$). Pada kondisi ini, bakteri melakukan penyesuaian dengan kondisi lingkungan, dan selanjutnya melakukan pertumbuhan cepat. Dari ke-3 suhu preparasi pada Gambar 2, ternyata suhu awal 35°C merupakan suhu yang lebih disenangi oleh *B. cereus* dibandingkan suhu 25°C maupun 70°C. Pada suhu tersebut spora tumbuh lebih cepat karena tidak perlu terlalu lama beradaptasi untuk menyesuaikan diri. Sedangkan spora *C. perfringens* nampak lebih cepat melakukan germinasi pada susu formula yang dipreparasi pada suhu 70°C. Suhu tersebut merupakan *heat shock* untuk

spora *C. perfringens*, sehingga spora terangsang untuk berubah menjadi sel vegetatif dan melakukan multiplikasi. Keadaan tersebut tercermin pada rata-rata waktu generasi yang lebih singkat yaitu 11 menit (Tabel 1).

Tabel 1 Rata-rata waktu generasi *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam susu formula yang dipreparasi dalam berbagai suhu

Suhu Preparasi (°C)	<i>B. cereus</i> (menit)	<i>C. perfringens</i> (menit)
25	42	56
35	24	-
47	-	21
70	37	11

Berdasarkan analisis *multiple comparison Games-Howell* pada beda rata-rata jumlah *B. cereus* dalam susu formula terlarut yang disimpan dalam suhu ruang, ternyata perbedaan peningkatan jumlah bakteri dengan sangat signifikan ($p < 0.01$) terjadi setelah jam ketiga penyimpanan, tetapi tidak untuk *C. perfringens* ($p > 0.01$). Pertumbuhan spora *B. cereus* sampai dengan 1 log terjadi setelah disimpan selama 3 jam yaitu dari jumlah rata-rata awal 2.7×10^3 CFU/ml (suhu preparasi 35°C) dan 2.5×10^3 CFU/ml (suhu preparasi 70°C) menjadi masing-masing adalah 5.4×10^4 CFU/ml dan 1.3×10^4 CFU/ml (Gambar 2). Becker *et al.*, (1994) merekonstitusi susu formula dan menambahkan kurang lebih 1.0×10^2 CFU/ml *B. cereus*, diinkubasi pada suhu 27°C, level 10^5 CFU/ml dicapai setelah 7-9 jam. Suhu awal preparasi ternyata berpengaruh pada kecepatan multiplikasi, dimana pada suhu 42°C kecepatan multiplikasi bervariasi antara 11-34 menit (Borge *et al.*, 2001). Dufrene *et al.*, (1995) melihat bahwa preinkubasi pada suhu 37°C akan meningkatkan durasi lag phase secara drastis.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa pertumbuhan spora *C. perfringens* sampai 1 log terjadi setelah 2 jam untuk susu yang dipreparasi pada suhu 45 dan 70°C. Susu yang mengandung spora *C. perfringens* yang dilarutkan pada suhu 25 dan 70°C mulai menurun pertumbuhannya setelah jam ke-3, kecuali untuk yang dipreparasi pada suhu 45°C. Pelarutan dengan menggunakan suhu 25°C dalam 2 jam mampu meningkatkan jumlah spora *C. perfringens* dari rata-rata 1.8×10^2 CFU/ml menjadi 1.9×10^3 CFU/ml sedangkan suhu 70 °C mampu meningkatkan dari rata-rata 3.0×10^2 CFU/ml menjadi 4.5×10^3 CFU/ml dan menurun setelah jam ke-3. Penurunan pada pola pertumbuhan tersebut menurut Smith *et al.*, (2004) antara lain dipengaruhi oleh oksigen lingkungan. Pada suhu 45°C dalam 3 jam mampu meningkatkan dari rata-rata 1.1×10^2 CFU/ml menjadi 6.9×10^3 CFU/ml, dan masih mampu bertahan untuk satu jam berikutnya. Pada suhu 37-45°C waktu generasi untuk *C. perfringens* dapat terjadi dalam 7.4 menit (Willardsen *et al.*, 1975).

Dengan demikian preparasi susu dengan air matang yang didinginkan sampai suhu 25°C tetap aman dari

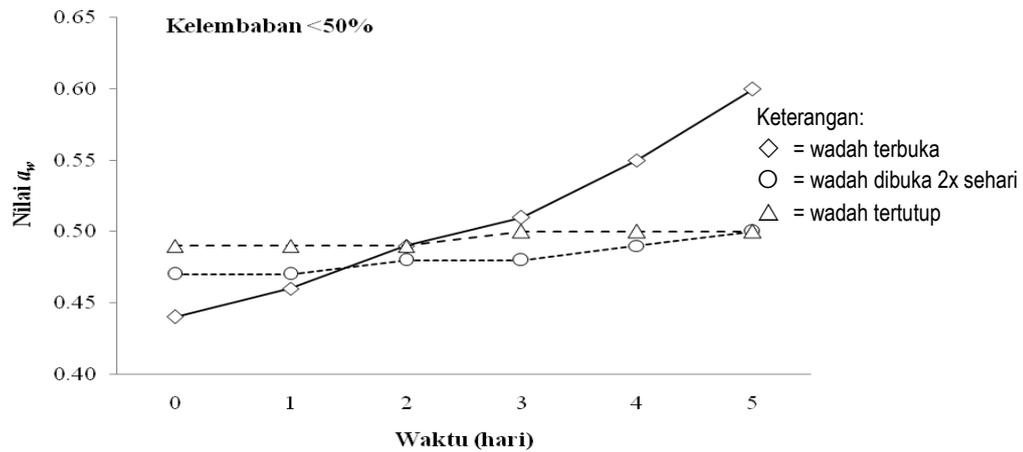
segi risiko *B. cereus* dan *C. perfringens*, asal air yang digunakan dididihkan dengan benar yaitu selama minimal 2 menit, melakukan cuci tangan dengan sabun dan air bersih sebelum preparasi, dan mencuci tempat minum dengan sabun dan air bersih serta merebusnya dalam air sampai mendidih (FAO/WHO, 2006). Setelah dipreparasi, susu sebaiknya tidak disimpan terlalu lama pada suhu ruang karena akan menggandakan jumlah mikroba didalamnya. Untuk meminimalkan risiko, disarankan untuk sesegera mungkin mengonsumsi susu formula yang telah dilarutkan dan memperpendek waktu konsumsi (*feeding time*) menjadi hanya dua jam, dan susu yang tidak habis diminum harus dibuang (Codex Alimentarius Commission, 2007). *Feeding time* yang disarankan Codex Alimentarius Commission tersebut dilandasi oleh penelitian yang dilakukan pada *E. sakazakii* dan *Salmonella* pada susu formula bubuk (FAO/WHO, 2006).

Pengaruh kelembaban udara dan lama penyimpanan pada spora *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam susu formula bubuk

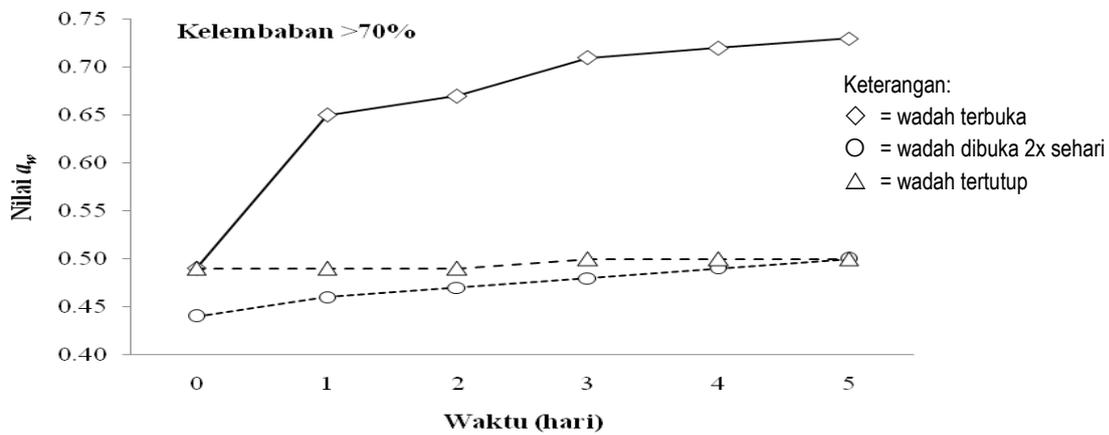
Kelembaban udara, baik tinggi (>70%) maupun rendah (<50%) secara nyata ($p < 0.05$) mempengaruhi a_w susu formula bubuk yang disimpan selama lima hari (Gambar 4 dan 5). Susu formula bubuk yang disimpan dalam wadah terbuka, akan menyerap lebih banyak uap air dari lingkungan, dibandingkan dengan yang hanya dibuka dua kali dalam sehari (Gambar 6), sehingga bubuknya terlihat menggumpal. Keadaan ini memperlihatkan bahwa setelah kemasan susu formula dibuka, maka kemasan harus ditutup dengan rapat, agar kekeringan produk tetap terjaga.

Spora *B. cereus* dapat bertahan pada susu formula bubuk yang memiliki a_w 0.44-0.60 (Gambar 4) dan spora *C. perfringens* pada a_w 0.44-0.74 (Gambar 5). Keadaan ini mirip dengan *E. sakazakii* yang diinkubasikan ke dalam susu formula berbahan dasar susu dan tepung kedelai, ternyata mampu bertahan pada rentang a_w 0.43-0.86 (Gurtier dan Beuchat, 2007).

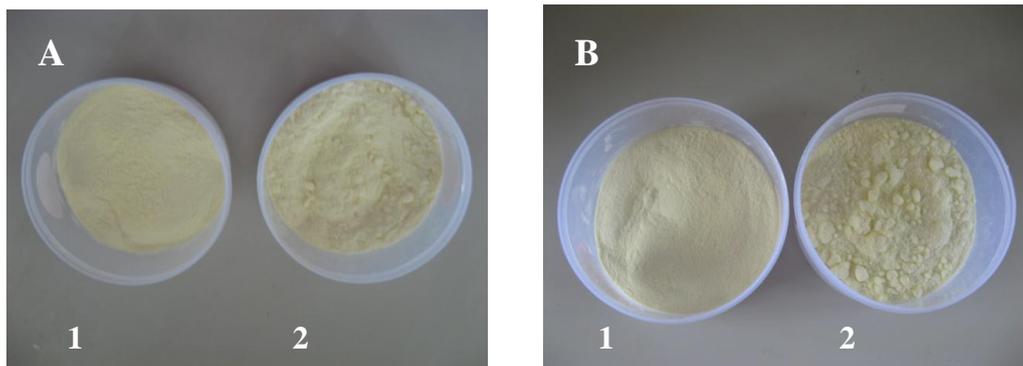
Berdasarkan hasil analisis *multiple comparison Games-Howell* pada susu formula yang dikontaminasi dengan *B. cereus*, beda rata-rata jumlah *B. cereus* secara nyata ($p < 0.05$) terjadi setelah dua hari penyimpanan (Gambar 7 dan 8). Suhu udara lingkungan (25-30°C) nampaknya memegang peranan yang cukup penting dalam germinasi spora *B. cereus*, ini terlihat dari bertambahnya bakteri pada susu formula yang disimpan dalam tempat yang tertutup dan yang dibuka 2 kali sehari walaupun nilai a_w cenderung tidak berubah dari hari ke hari (Gambar 4 dan 5). *B. cereus* mulai menurun jumlahnya pada susu formula yang disimpan dalam tempat tertutup maupun yang terbuka (disimpan dalam tingkat kelembaban >70%) dan memiliki nilai a_w minimal 0.5 sejak hari ke-4. Jaquette dan Beuchat (1998) melihat bahwa kematian spora *B. cereus* yang diinkubasikan ke dalam bubur bayi beras cereal yang disimpan selama 48 minggu dan disimpan pada suhu 45°C, dipertinggi oleh nilai a_w 0.78.



Gambar 4 Perubahan nilai a_w susu formula pada berbagai cara penyimpanan di ruang berkelembaban <50% selama 5 hari



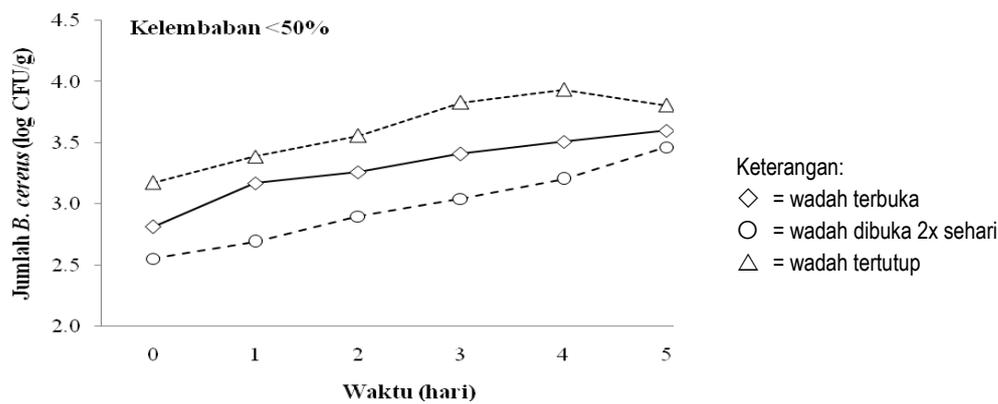
Gambar 5 Perubahan nilai a_w susu formula pada berbagai cara penyimpanan di ruang berkelembaban >70% selama 5 hari



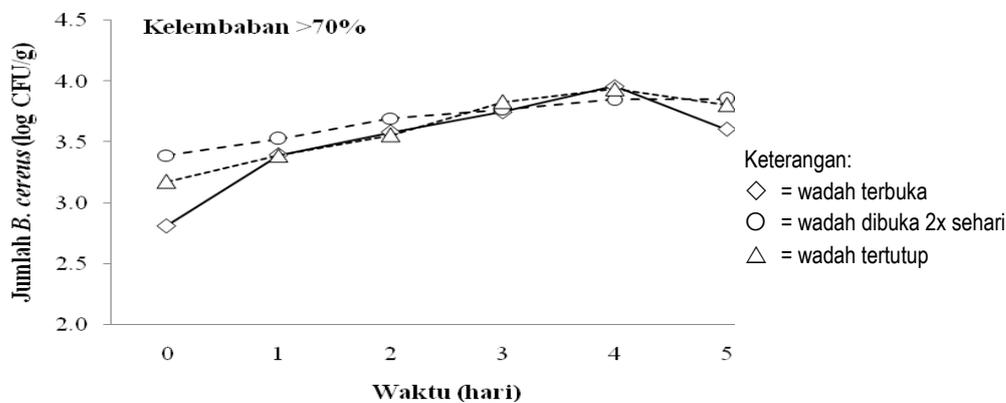
Gambar 6 Perubahan partikel susu formula bubuk setelah 5 hari penyimpanan

Keterangan:

- A. Susu formula yang disimpan dalam kelembaban <50%
- B. Susu formula yang disimpan dalam kelembaban >70%
- 1. Susu formula dikontaminasi dengan perlakuan dibuka 2 kali sehari
- 2. Susu formula dikontaminasi dengan perlakuan terbuka



Gambar 7 Pertumbuhan spora dan sel vegetatif *B. cereus* dalam susu formula bubuk yang ditempatkan dalam berbagai tipe wadah dan disimpan pada ruang berkelembaban <50% selama 5 hari

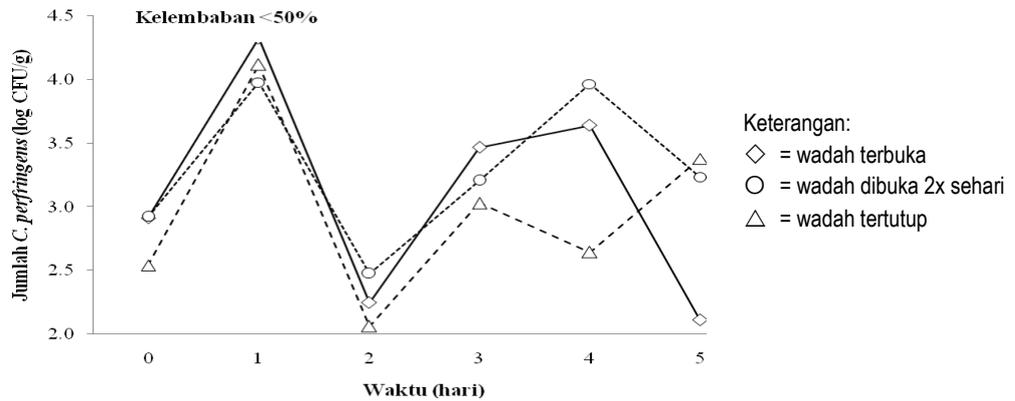


Gambar 8 Pertumbuhan spora dan sel vegetatif *B. cereus* dalam susu formula bubuk yang ditempatkan dalam berbagai tipe wadah dan disimpan pada ruang berkelembaban >70% selama 5 hari

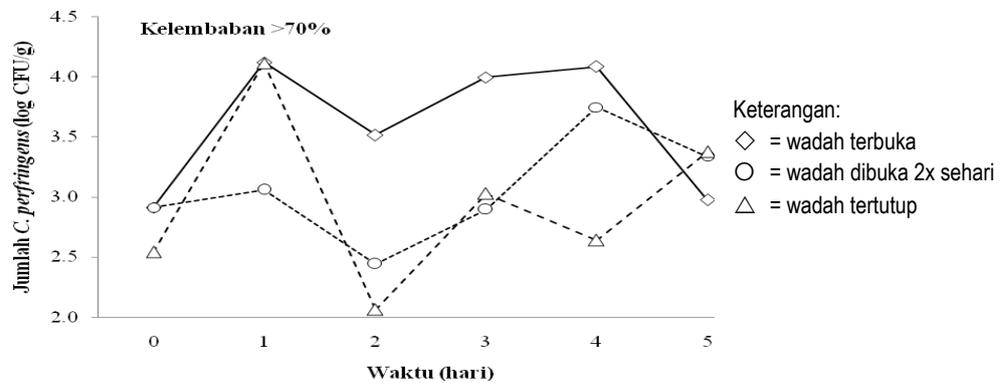
Kemampuan germinasi spora *C. perfringens* dalam 24 jam pertama mencapai 2 log untuk perlakuan wadah tertutup dan terbuka, yaitu dari rata-rata 8.1×10^2 CFU/g menjadi 2.1×10^4 CFU/g dan dari rata-rata 3.5×10^2 CFU/g menjadi 1.3×10^4 CFU/g, sedangkan pada yang dibuka 2 kali sehari hanya mencapai 1 log yaitu dari rata-rata 8.3×10^2 CFU/g menjadi 9.5×10^3 CFU/g (Gambar 9 dan 10). Kalinowski *et al.* (2003) melihat spora *C. perfringens* yang diinokulasikan pada daging dada kalkun yang disimpan pada suhu 26.7 dan 32.2°C, dalam 6 jam akan meningkat jumlahnya 1 dan 3 log CFU/g. Juneja *et al.* (1994) melihat bahwa pola pertumbuhan *C. perfringens* pada daging yang dimasak akan naik 2 log setelah 12 jam pada suhu penyimpanan 28°C pada kondisi aerob. Pada kondisi anaerob, pada suhu yang sama kenaikannya dapat mencapai 4 log, yaitu dari rata-rata 10^3 CFU/g menjadi 10^7 CFU/g. Berdasarkan hasil analisa *multiple comparison Games-Howell* pada beda rata-rata kemampuan bertahan

spora *C. perfringens* dalam susu formula bubuk secara signifikan berbeda sejak hari pertama ($p < 0.05$).

Pada hari ke-2, jumlah spora *C. perfringens* yang germinasi menurun dengan tajam pada susu yang disimpan pada kondisi kelembaban lebih rendah (<50%), setelah itu pertumbuhan meningkat sampai hari ke-3 dan menurun kembali pada hari ke-4. Penurunan tersebut kemungkinan karena *C. perfringens* semakin kontak dengan oksigen yang ada di udara. Aktivitas air juga sangat mempengaruhi pertumbuhan spora *C. perfringens*, nilai a_w 0.65 atau lebih ($p < 0.05$) perlu diwaspadai. Decaudin dan Tholozan (1995) melihat bahwa kondisi dan strain yang berbeda sangat mempengaruhi pola pertumbuhan dan sporulasi *C. perfringens*.



Gambar 9 Kemampuan bertahan spora *C. perfringens* dalam susu formula bubuk yang tempatkan dalam berbagai tipe wadah dan disimpan pada ruang berkelembaban <math><50\%</math> selama 5 hari



Gambar 10 Kemampuan bertahan spora *C. perfringens* dalam susu formula bubuk yang tempatkan dalam berbagai tipe wadah dan disimpan pada ruang berkelembaban >math>>70\%</math> selama 5 hari

KESIMPULAN DAN SARAN

Pertumbuhan spora *B. cereus* dan *C. perfringens* pada susu formula yang dipreparasi tidak bergantung pada suhu awal preparasi tetapi oleh lama waktu penyimpanan di suhu ruang (28-29°C). Spora *B. cereus* dan *C. perfringens* mampu bertahan dalam bubuk susu formula, kemampuan tersebut dipengaruhi oleh cara penyimpanan, dimana semakin terbuka bubuk susu formula disimpan semakin meningkat potensi spora untuk bertahan dan melakukan germinasi.

Dengan demikian, jika susu formula sudah dilarutkan sebaiknya segera dikonsumsi, dan tidak disimpan terlalu lama di suhu ruang. Kemasan susu formula yang sudah dibuka sebaiknya disimpan serapat mungkin, karena setelah terbuka, kondisi lingkungan akan meningkatkan nilai a_w bubuk susu, dan merangsang spora kedua bakteri untuk tumbuh dan melakukan multiplikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderton A, 1993. Bacterial contaminant of enteral foods and feeding system. *Clin. Nutr.* 12:97-113.
- Becker H, Schaller G, Wise Von W, dan Teplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant food and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* 23(1):1-15.
- Borge GIA., Skeie M, Sørhaug T, Langsrud T, dan Granum PE. 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* 69:237-246.
- Brynstad S, dan Granum PE. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food. Microbiol.* 74:195-202.
- Codex Alimentarius Commission. 2007. *Proposed Draft Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children at Step 3.* CX/FH 07/39/4.

- Cohen J, Marambio E, Lynch B, dan Moreno AM. 1984. Infección por *Bacillus cereus* en recién nacidos [Abstract]. *Rev. Chil. de Pediatr.* 55:20-25.
- Decaudin M, dan Tholozan J. 1995. A comparative study on the conditions of growth and sporulation of three strains of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* 42:298-304.
- Dufrene J, Bijwaard M, Giffel te M, Beumer R, dan Notermans S. 1995. Characteristics of some psychrotropic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 27:175-183.
- [EFSA] European Food Safety Authority, 2004. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal* 113:1-35.
- Efuntoye MO, dan Adetosoye AI. 2004. Sporadic diarrhoea due to *Clostridium perfringens* in children aged five year or below. *Afr. J. Biotech.* 3:366-369.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report, *Microbiological Risk Assessment Series 10*.
- Gericke B, dan Thurn V. 1994. Identification of infant food as a vehicle in nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: epidemiological subtyping by allozyme whole cell protein and antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 76:553-558.
- Gurtier JB, dan Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Prot.* 70:1579-1586.
- [ICMSF] International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1996. *Microorganism in Food. 5 Characteristic of Microbial Pathogens*. Blackie Academic and Professional, London.
- Jaquette CB, dan Beuchat LR. 1998. Survival and growth of psychrotropic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *J. Food Prot.* 61:1629-1635.
- Jay JM. 2000. *Modern Food Microbiology*. Ed. ke-6. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Juneja VK, Marmer BS, dan Miller AJ. 1994. Growth and sporulation potential of *Clostridium perfringens* in aerobic and vacuum-packaged cooked beef. *J. Food Prot.* 57:393-398.
- Kramer JM, dan Gilbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* Species. Di dalam M.P. Doyle, editor. *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Labbe R. 1989. *Clostridium perfringens*. Di dalam M.P. Doyle, editor. *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Decker, Inc., New York.
- Louie KK. 1993. *Salmonella* serotype Tennessee in powdered milk product and infant formula-Canada and United States. *J. Am. Med. Assoc.* 270:432.
- Oxoid 1998. *The Oxoid Manual*. E.Y. Bridson, editor. Ed. ke-8. Oxoid Limited, Hampshire.
- Ray B. 2001. *Fundamental Food Microbiology*. Ed. ke-2. CRC Press, Boca Raton.
- Rhodehamel EJ., dan SM. Harmon, 1998a. *Bacillus cereus*. Di dalam *Bacteriological Analytical Manual*. Ed. ke-8 rev. Food and Drug Administration, Washington.
- Rhodehamel EJ, dan Harmon SM. 1998b. *Clostridium perfringens*. Di dalam *Bacteriological Analytical Manual*. Ed. ke-8 rev. Food and Drug Administration, Washington.
- Rowan NJ, Anderson JG, dan Anderton AA. 1997. Bacteriological quality of infant milk formulae examined under a variety of preparation and storage conditions. *J. Food Prot.* 60:1089-1094.
- Smith S, Juneja V, dan Schaffner DW. 2004. Influence of several methodological factors on the growth of *Clostridium perfringens* in cooling rate challenge studies. *J. Food Prot.* 67:1128-1132.
- Todar K. 2005. The Genus *Bacillus*. Di dalam *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison [terhubung berkala], <http://www.textbookofbacteriology.net> [4 November 2006].
- Willardsen RR, Busta FF, dan Allen CE. 1975. Growth of *Clostridium perfringens* in three different beef media and fluid thuyoglycollate medium at static and constantly rising temperatures. *J. Food Prot.* 42:144-148.