

Penelitian/Research

PENGARUH SUHU REKONSTITUSI TERHADAP ISOLAT LOKAL *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* sp.) ASAL SUSU FORMULA DAN MAKANAN BAYI

The Effect of Reconstitution Temperature for Local Isolates of Enterobacter sakazakii (Cronobacter sp.) from Powdered Infant Formula and Weaning Food

Yuliasri Ramadhani Meutia¹, Ratih Dewanti-Hariyadi², Sri Estuningsih³

¹Balai Besar Industri Agro, Jl. Juanda No. 11 Bogor 16122

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor

³Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor

ABSTRACT: *Enterobacter sakazakii* (recently known as novel genus *Cronobacter* sp.) is opportunistic bacteria which can cause severe meningitis in neonates. Eight isolates of *E.sakazakii* which previously isolated from powdered infant formula (PIF) and weaning food were tested for their ability to survive during reconstitution with water having various temperatures, and their fate during hang time in comparison with 7 isolates previously described by Estuningsih and *E.sakazakii* ATCC 352/7. Reconstitution with 100°C water decreased the number of bacteria of most isolates to undetectable level, while those with 40°C and 4°C water did not reduce the bacterial number significantly. Using water of 70°C, reconstitution decreased the number of bacteria of 10 isolates to undetectable levels; however 6 isolates survived the reconstitution temperatures. The hang time test showed that some bacteria which were not detected after reconstitution with 70°C water became detectable after 2 hours. Those surviving reconstitution with 70°C grew well during hang time for 2 to 8 hours.

Keywords: *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter* sp., Powdered Infant Formula, Reconstitution, Hang Time

PENDAHULUAN

Enterobacter sakazakii merupakan bakteri patogen yang telah lebih dari 20 tahun terakhir ini dilaporkan dapat menyebabkan beberapa kasus kematian serta penyakit pada bayi-bayi yang lahir prematur. *E.sakazakii* pada kasus bayi baru lahir yang mengalami meningitis dan *necrotizing enterocolitis* telah dikaitkan dengan konsumsi susu bubuk formula (Van Acker *et al.* 2001). Morbiditas dari meningitis yang disebabkan oleh *E.sakazakii* sangat tinggi. Jika pasien tidak meninggal, maka infeksi ini dapat menyebabkan keterbelakangan fisik dan mental (Lai, 2001).

E.sakazakii berbahaya khususnya pada bayi yang baru lahir (*neonatal*) dengan status kesehatan yang rendah, termasuk di dalamnya bayi baru lahir berusia 28 hari, bayi prematur, bayi yang berbobot lahir rendah, bayi yang secara spesifik mengalami *immuno-compromised*, serta bayi dari ibu yang terinfeksi HIV. Ulasan kasus antara tahun 1961

hingga 2003 menemukan bahwa 25 kasus (52%) terjadi pada bayi yang berbobot lahir rendah yang mengkonsumsi susu formula (Anonim, 2004).

Sebagian besar wabah *E.sakazakii* yang terjadi dilaporkan berasal dari susu formula yang terkontaminasi, karena susu formula tidak dirancang sebagai produk dengan hasil akhir steril. Muytjens *et al.* (1988) menemukan bahwa 52.2% dari 141 sampel susu formula dari 35 negara telah terkontaminasi dengan *Enterobacteriaceae*, dimana 25% mengandung *E.agglomerans*, 21% mengandung *E.cloacae*, dan 14% mengandung *E.sakazakii*. *E.sakazakii* juga berhasil diisolasi dari produk susu formula bayi yang tidak terpakai dari 13 negara, dengan level kontaminasi 0.36 hingga 66.0 CFU/ 100 g. Nilai tersebut setara dengan nilai 8 sel /100g yang dilaporkan oleh Simmons *et al.* (1989) untuk susu bubuk formula yang telah terbuka kalengnya yang digunakan pada saat terjadinya wabah pada ruang *intensive care unit* (ICU) untuk bayi yang baru lahir.

Nazarowec-White and Farber (1997) melakukan pengujian terhadap 120 kaleng susu formula dari lima perusahaan yang berbeda di Kanada dan menemukan bahwa 6.7% mengandung *E.sakazakii*. Jumlah *E.sakazakii* pada sampel yang positif umumnya adalah 0.36 CFU /100 g. Heuvelink *et al.* (2001) menggunakan uji *present/absence* dalam 25 g susu bubuk, mendeteksi *E.sakazakii* pada 1 dari 40 susu bubuk formula untuk bayi dan 7 dari 170 susu bubuk. Estuningsih *et al.* (2006) melaporkan bahwa dari 74 sampel makanan bayi di Indonesia dan Malaysia, 35 sampel (47%) positif mengandung *Enterobacteriaceae* dan 10 sampel (13,5%) positif mengandung *E.sakazakii*.

Karena hanya sedikit informasi mengenai *E.sakazakii* di Indonesia, tidak diketahui resiko bakteri ini terhadap bayi di Indonesia, sementara kematian bayi yang terjadi tidak selalu diketahui penyebabnya. Oleh karena itu perlu diketahui lebih banyak data keberadaan *E.sakazakii* dalam susu formula dan makanan bayi, serta sifat-sifat dasar *E.sakazakii* agar dapat dilakukan tindakan pengendalian bahaya.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kemampuan isolat lokal *E.sakazakii* untuk bertahan dalam kondisi rekonstitusi susu formula dan makanan bayi. Penelitian ini diharapkan dapat menambah basis data mengenai *E.sakazakii* sehingga dapat membantu dalam analisis risiko serta penanganan bakteri ini dalam bahan pangan khususnya susu formula dan makanan bayi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah susu formula dan makanan bayi berbagai merk diperoleh dari supermarket/ toko di Bogor. Media yang digunakan untuk pengaruh suhu rekonstitusi dan *hang time* adalah *Bufered-Peptone Water* (BPW) (CM 509 Oxoid Ltd., Basingstoke, UK); *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* (SIGMA), larutan pengencer NaCl fisiologis (Merck), dan *Druggan-Forsythe-Iversen* (DFI) Agar (Oxoid,UK), akuades steril, dan susu skim. Kultur bakteri yang digunakan adalah 8 isolat *E.sakazakii* yaitu YR c3a, YR k1b, YR k2a, YR k3a, YR w1, YR w3, YR t 2a, dan YR t2b (Meutia,2008). Sebagai pembanding digunakan 7 isolat yang telah diidentifikasi sebelumnya oleh Estuningsih *et*

al. (2006) (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7) serta isolat *E.sakazakii* ATCC 352/7. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patogen - Mikrobiologi Pangan, SEAFAST (*South East Asia Food and Agriculture Science and Technology*) Center IPB Bogor.

Alat

Alat-alat utama yang digunakan pada penelitian ini adalah penangas air yang bertutup (Poly Science, kapasitas 20 liter dan suhu maksimum 100°C), termometer alkohol (0 – 110°C), inkubator 37°C (Mettler), neraca analitik (Sartorius), pipet volumetrik 1, 5, dan 10 ml (pyrex); pipet mikro berikut tip 1 ml, dan 0.1 ml (Gilson); batang gelas pengaduk; jarum ose; erlenmeyer berukuran 250 ml, 125 ml, dan 500 ml (Pyrex); botol bertutup kapasitas 500 ml; tabung reaksi bertutup (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), cawan petri (Iwaki, pyrex), plastik steril, pH meter (Thermo), oven (Fisher model 550), vorteks (genie 2), *freeze dryer* (Labconco), dan *autoclave* (APL)

Metode

Pengaruh Suhu Air Rekonstitusi terhadap *E.sakazakii*

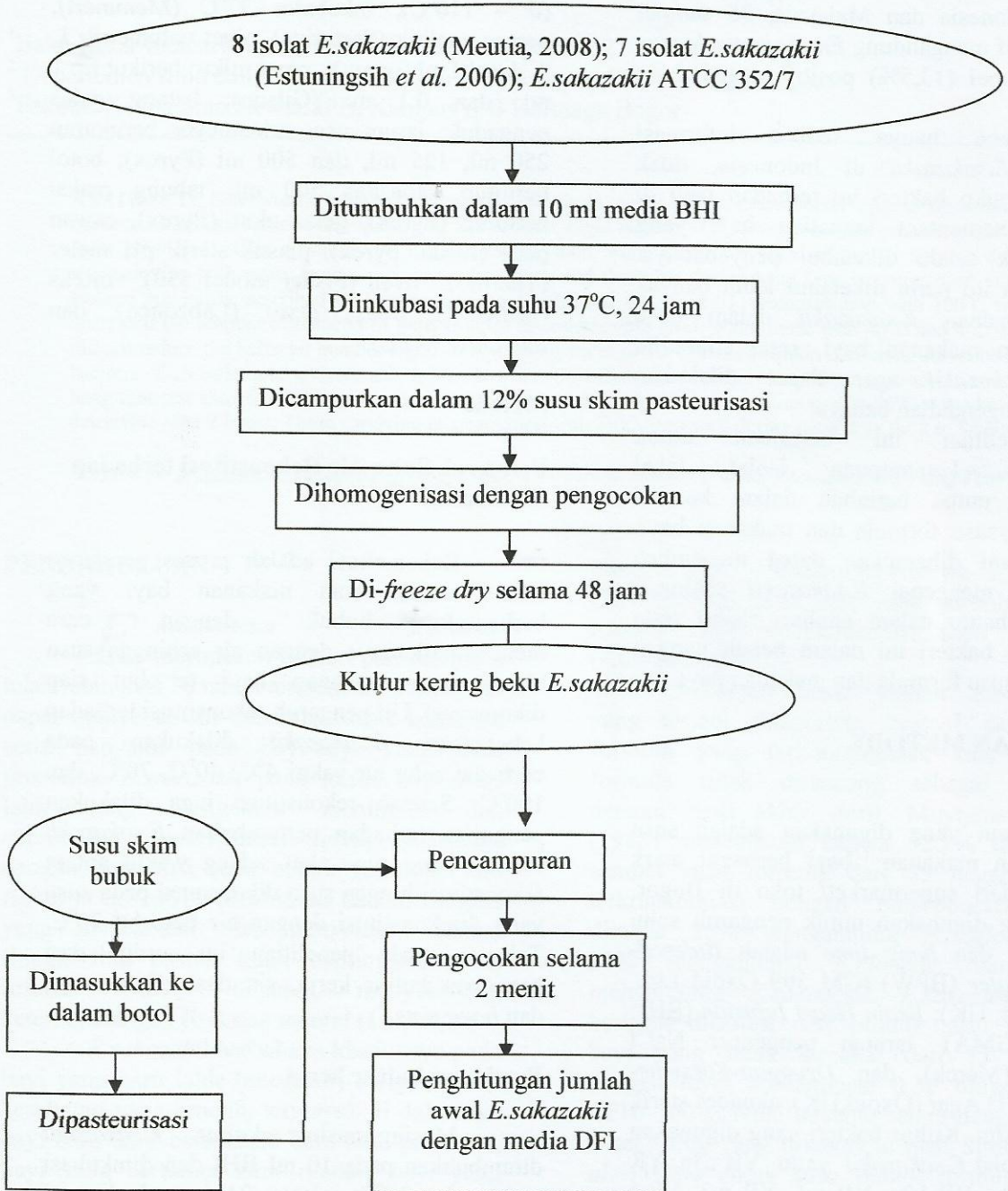
Rekonstitusi adalah proses persiapan susu formula atau makanan bayi yang berbentuk bubuk dengan cara mencampurkannya dengan air sehingga susu bubuk atau makanan bayi tersebut siap dikonsumsi. Uji pengaruh rekonstitusi terhadap keberadaan *E.sakazakii* dilakukan pada berbagai suhu air yakni 4°C, 40°C, 70°C, dan 100°C. Setelah rekonstitusi juga dilakukan pengujian terhadap pertumbuhan *E.sakazakii* selama *hang time* atau selang waktu antara rekonstitusi hingga susu dikonsumsi pada susu yang direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C. Tahapan pada penelitian ini terdiri dari persiapan kultur kerja, simulasi rekonstitusi, dan *hang time*.

Persiapan kultur kerja.

Masing-masing kultur *E.sakazakii* ditumbuhkan pada 10 ml BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat sel *E.sakazakii* yang ditumbuhkan pada BHI dicampurkan dengan susu skim 12% yang sudah dipasteurisasi hingga tercampur secara

homogen kemudian dikeringkan dengan menggunakan *freeze drier* selama 48 jam. Sebelum dimasukkan ke dalam *freeze drier* dilakukan *plating* untuk mengetahui jumlah sel awal. Setelah diperoleh sel berbentuk kering beku kemudian dicampurkan pada 100 g susu skim bubuk yang telah terlebih dahulu dipasteurisasi pada suhu 65°C selama 30 menit, yang ditempatkan pada botol bertutup berukuran 500 ml. Botol yang berisi susu bubuk dan kultur kering beku tersebut ditutup

dengan rapat. Selanjutnya dilakukan pengocokan (*shaking*) selama 2 menit. Sebanyak masing-masing 10 g susu yang diinokulasi dicampur dengan 90 ml media BPW. Jumlah *E.sakazakii* pada susunan terinokulasi ini dihitung dengan *plating* pada media DFI sebagai jumlah susu bubuk sebelum direkonstitusi. Masing-masing cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Skema proses persiapan kultur kerja dapat dilihat pada Gambar 1.



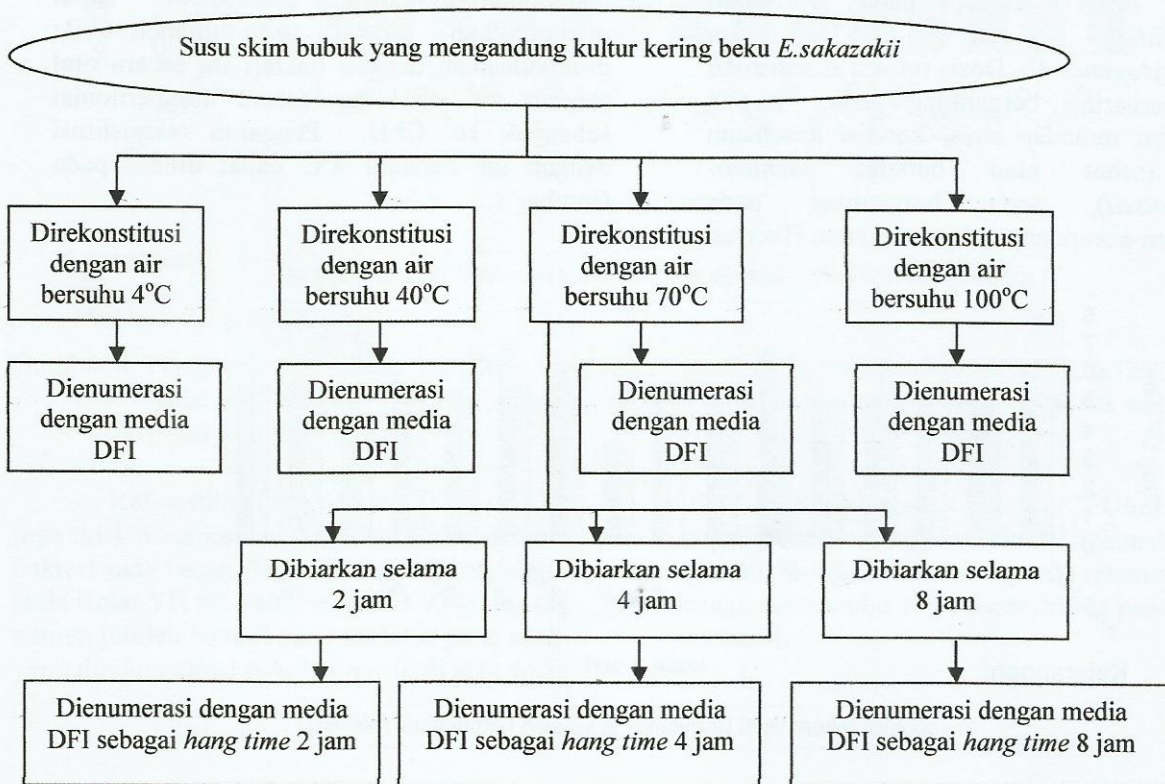
Gambar 1. Skema proses persiapan kultur kerja *E.sakazakii*

Pengaruh Suhu Air Rekonstitusi dalam Penyiapan Susu Formula.

Susu skim yang telah dicampur dengan isolat *E.sakazakii* pada tahap persiapan direkonstitusi dengan menggunakan akuades steril dengan suhu yang berbeda-beda. Suhu rekonstitusi yang digunakan adalah 4°C, 40°C, 70°C, dan 100°C. Sebanyak 10 g susu terinokulasi direkonstitusi dengan akuades steril sehingga volume larutan adalah 100 ml. Masing-masing tahapan rekonstitusi dienumerasi atau dihitung jumlahnya dengan menggunakan media DFI.

Uji Hang Time.

E.sakazakii yang bertahan dalam susu bubuk yang telah direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C di atas diuji perilakunya selama masa *hang time*-nya. Jumlah *E.sakazakii* dienumerasi dalam selang waktu *hang time* 2 jam, 4 jam, dan 8 jam dengan menggunakan medium DFI. Skema proses pengujian pengaruh suhu rekonstitusi dan *hang time* terhadap *E.sakazakii* untuk masing-masing isolat yang diujikan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema pengujian pengaruh suhu rekonstitusi dan *hang time* terhadap *E.sakazakii*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Suhu Rekonstitusi terhadap *E.sakazakii*

Tahap persiapan dilakukan dengan metode pengeringan beku (*freeze dry*) diharapkan untuk mendapatkan isolat dalam bentuk kering sehingga dapat dicampurkan ke dalam susu bubuk sebagai simulator. Pemilihan metode kering beku juga dilakukan dengan harapan mendapat jumlah *E.sakazakii* yang cukup tinggi sebagai jumlah awal sebelum rekonstitusi. Kondisi yang ekstrim

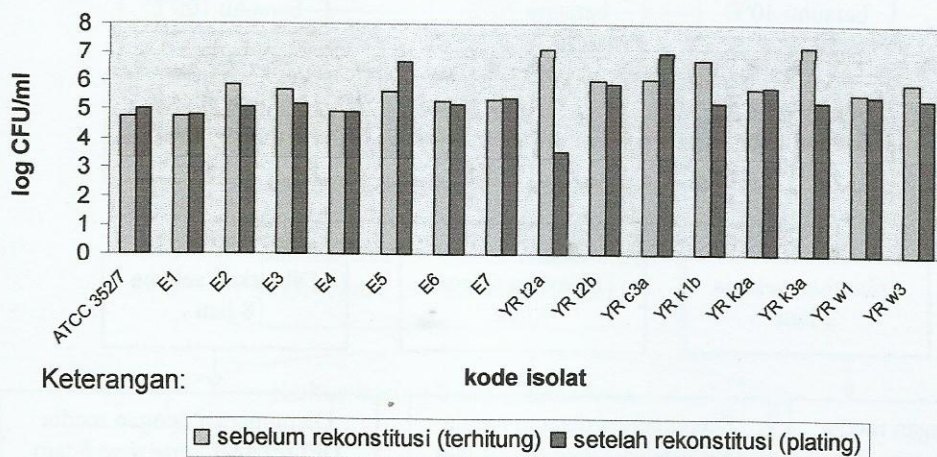
diciptakan untuk melihat seberapa besar pengaruh suhu rekonstitusi tersebut terhadap *E.sakazakii*. Isolat yang sudah dicampur dengan susu bubuk sebagai persiapan simulasi dienumerasi sebagai jumlah awal *E.sakazakii* yang terdapat pada susu formula.

Susu bubuk yang telah dicampur *E.sakazakii* dalam jumlah tertentu direkonstitusi di berbagai suhu yang berbeda untuk melihat seberapa besar pengaruh rekonstitusi terhadap susu yang mengandung *E.sakazakii*. Rekonstitusi dilakukan pada suhu 100°C, 70°C, 40°C, dan 4°C. Pengaruh suhu

rekonstitusi 4°C, 40°C, dan 70°C dapat dilihat pada Gambar 3, 4, dan 5.

Rekonstitusi dengan suhu 100°C mengakibatkan tidak terdeteksinya semua isolat *E.sakazakii* kecuali isolat E2 dan YR w3 yang masing-masing masih menyisakan bakteri sebesar 1.15×10^1 CFU/ml, namun jumlah tersebut masih di bawah dosis infeksi minimum *E.sakazakii*. Meskipun tidak ada bukti secara epidemiologis tentang dosis infeksi, Iversen and Forsythe (2003) memperkirakan 1000 sel sebagai konsentrasi awal *E.sakazakii* yang dapat menyebabkan infeksi. Hal ini cukup beralasan karena sama dengan dosis infeksi pada *Neisseria meningitidis*, *E.coli* O157, dan *L.monocytogenes* 4b. Dosis infeksi *E.sakazakii* dapat bervariasi bergantung pada respon bakteri ini terhadap stres, kondisi kesehatan inang (sehat atau bersifat *immuno-compromised*), serta bergantung pada komponen-komponen dalam makanan (Iversen

and Forsythe, 2003). Pada kasus bayi yang baru lahir yang diberikan susu formula, bila dilihat dari sisi mikroianya, *E.sakazakii* telah mengalami kondisi stres selama pengeringan semprot (*spray drying*) dan penyimpanan. Bila dilihat dari sisi inangnya, dalam hal ini bayi yang baru lahir, bayi merupakan golongan individu yang memiliki daya tahan tubuh yang masih lemah karena bayi yang baru lahir belum mampu membentuk antibodi dalam dirinya hingga berusia 2 bulan, sehingga bayi yang baru lahir dapat dikatakan bersifat *immuno-compromised* (Roitt, 2001). Nazarowec-White and Farber (1997) melaporkan bahwa *E.sakazakii* dapat menimbulkan infeksi pada mencit bila diinokulasikan dengan bakteri ini secara oral sebesar 10^5 CFU dan secara intraperitoneal sebanyak 10^3 CFU. Pengaruh rekonstitusi dengan air bersuhu 4°C dapat dilihat pada Gambar 3.



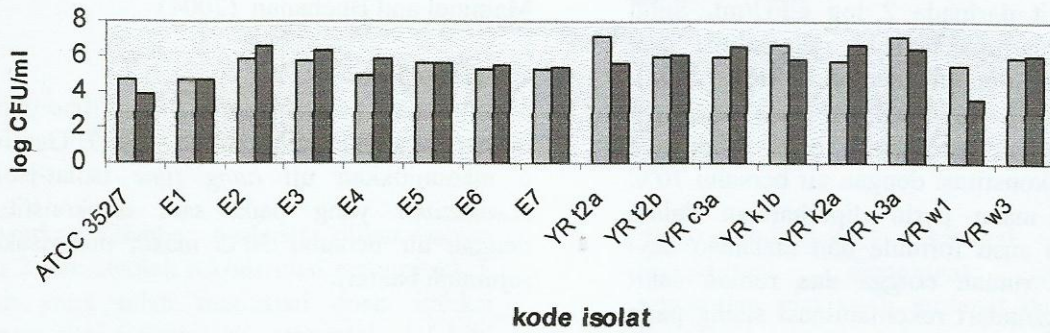
Gambar 3. Pengaruh suhu rekonstitusi 4°C terhadap *E.sakazakii*. Isolat *E.sakazakii* ATCC 352/7, isolat E1 – E7 adalah isolat Estuningsih *et al.* (2006), isolat YR t2a sampai YR w3 adalah isolat Meutia (2008).

E.sakazakii yang direkonstitusi dengan air bersuhu 4°C tidak mengalami reduksi yang terlalu besar. Sebagian besar isolat mengalami penurunan tidak lebih dari 2 log CFU/ml atau tidak lebih dari 10^2 CFU/ml. Hanya 2 isolat yang menunjukkan penurunan cukup besar pada rekonstitusi 4°C ini yaitu YR t2a yang mengalami penurunan sebesar 3.59 siklus log dan YR k3a yang mengalami penurunan sebesar 1.71 siklus log. Meskipun 2 isolat tersebut mengalami penurunan paling besar dibanding isolat-isolat lainnya, namun jumlah bakteri yang terdapat pada susu masih

mencapai dosis infeksi minimumnya yaitu 3.54 log CFU/ml untuk YR t2a dan 5.31 log CFU/ml untuk YR k3a dengan catatan jumlah bakteri awal pada susu berturut-turut adalah 7.13 log CFU/ml dan 7.02 log CFU/ml. Suhu air rekonstitusi 4°C tidak efektif untuk menginaktivasi *E.sakazakii* karena penurunan jumlah *E.sakazakii* yang terjadi tidak terlalu besar. Tetapi suhu ini juga tidak mendukung pertumbuhan *E.sakazakii* sehingga dapat digunakan sebagai suhu penyimpanan yang baik untuk susu formula yang sudah direkonstitusi seperti penelitian yang dilakukan

oleh Li-Chun *et al.* (2007) yang merekonstitusi makanan bayi berbahan dasar susu yang telah diinokulasikan dengan 10 campuran galur *E.sakazakii* dengan populasi sebanyak 0.02 dan 0.53 CFU/ml, kemudian menyimpan makanan bayi tersebut pada berbagai suhu yaitu 4°C, 12°C, 21°C, dan 30°C hingga 72

jam. Suhu rekonstitusi tidak dijelaskan namun hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *E.sakazakii* tidak dapat tumbuh pada formula yang disimpan pada 4°C, meskipun bakteri ini masih dapat terdeteksi dengan perlakuan *enrichment* setelah rekonstitusi.



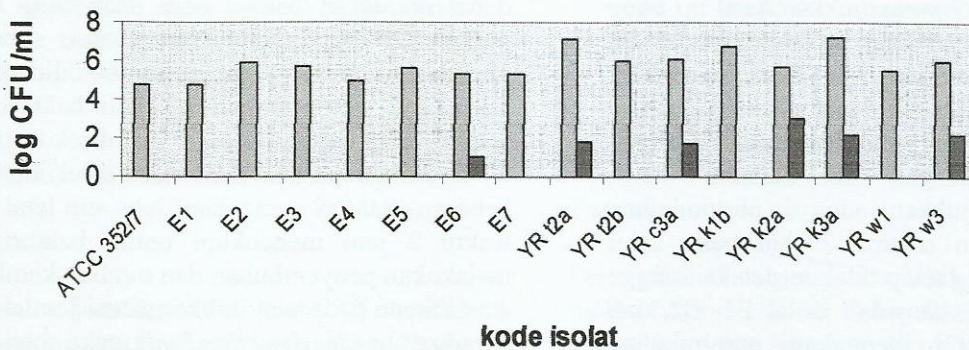
Keterangan:

■ sebelum rekonstitusi (terhitung) ■ setelah rekonstitusi (plating)

Gambar 4. Pengaruh suhu rekonstitusi 40°C terhadap *E.sakazakii*. Isolat *E.sakazakii* ATCC 352/7, isolat E1 – E7 adalah isolat Estuningsih *et al.* (2006), isolat YR t2a sampai YR w3 adalah isolat Meutia (2008).

Rekonstitusi dengan air bersuhu 40°C juga tidak memperlihatkan penurunan jumlah bakteri yang besar. Penurunan terbesar adalah pada isolat YR w1 yaitu sebesar 1.92 siklus log namun jumlah bakteri yang terdapat pada susu yang direkonstitusi tersebut masih di atas dosis

infeksi *E.sakazakii* yaitu 3.63 log CFU/ml dengan jumlah sel awal sebelum direkonstitusi adalah 5.55 log CFU/ml. Pengaruh rekonstitusi dengan air bersuhu 40°C dapat dilihat pada Gambar 4.



Keterangan:

■ sebelum rekonstitusi (terhitung) ■ setelah rekonstitusi (plating)

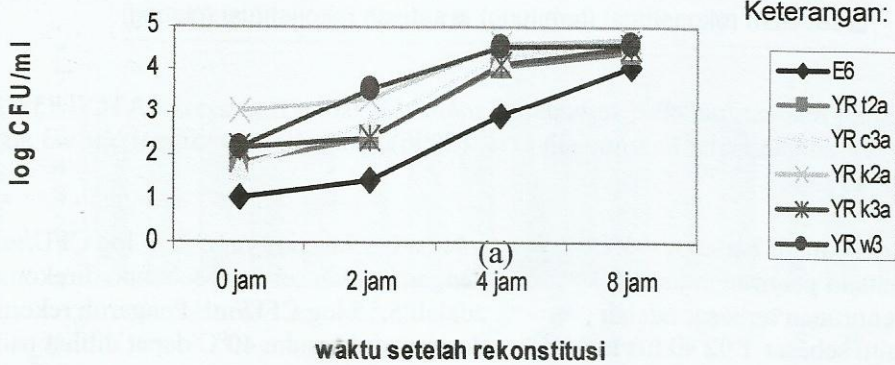
Gambar 5. Pengaruh suhu rekonstitusi 70°C terhadap *E.sakazakii*. Isolat *E.sakazakii* ATCC 352/7, isolat E1 – E7 adalah isolat Estuningsih *et al.* (2006), isolat YR t2a sampai YR w3 adalah isolat Meutia (2008).

Pengaruh rekonstitusi dengan air bersuhu 70°C dapat dilihat pada Gambar 5. Pada jumlah kontaminasi awal yang tinggi, secara umum dapat dilihat bahwa suhu 70°C cukup memadai digunakan sebagai suhu rekonstitusi susu formula dan makanan bayi. Sesuai penelitian yang dilakukan oleh Nazarowec-White and Farber (1997) bahwa suhu di atas 70°C dapat menurunkan jumlah *E.sakazakii* hingga jumlah yang terdeteksi lebih sedikit daripada 2 log CFU/ml. Suhu 70°C juga merupakan suhu rekonstitusi susu formula yang dianjurkan oleh ICMSF (2002). Mengingat terdapat satu galur pada penelitian ini yang masih mencapai dosis infeksiya setelah direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C (YR k2a) maka perlu diperhatikan dalam penanganan susu formula dan makanan bayi pada skala rumah tangga dan rumah sakit untuk menghindari rekontaminasi silang pada

saat penyimpanan susu formula yang su- terbuka agar jumlahnya tidak melebihi 5 CFU/g sehingga cukup aman b- direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C. Su- 100°C tidak direkomendasikan sebagai su- rekonstitusi meskipun dapat membun- seluruh *E.sakazakii* pada sebagian besar iso- karena mempertimbangkan rusakn- komponen gizi pada susu formula sepe- penelitian yang dilakukan oleh Edels- Mammel and Buchanan (2004).

Uji Hang Time.

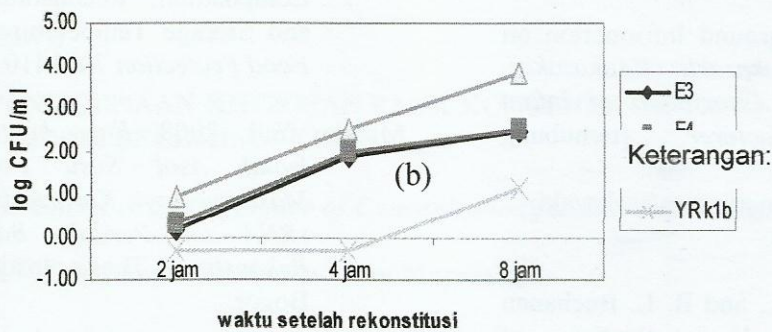
Hasil pengamatan uji *hang time* da- dilihat pada Gambar 6 dan Gambar 7. Gamb- 6 menunjukkan uji *hang time* isolat-iso- *E.sakazakii* yang pada saat direkonstitu- dengan air bersuhu 70°C masih menyisak- sejumlah bakteri.



Gambar 6. Pertumbuhan *E.sakazakii* selama *hang time* untuk isolat yang terdeteksi pasca rekonstitusi suhu 70°C

Gambar 7 menunjukkan hasil uji *hang time* pada isolat yang tak terdeteksi pada saat direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C. Berdasarkan Gambar 7 dapat diketahui bahwa beberapa isolat yang tidak terdeteksi pada saat direkonstitusi dengan air bersuhu 70°C, ternyata menunjukkan adanya pertumbuhan setelah dibiarkan selama 2 jam pada suhu ruang. Isolat yang tetap tidak terdeteksi hingga 8 jam *hang time* hanyalah isolat E1, E2, dan E7. Isolat YR t2b mengalami pertumbuhan pada 8 jam setelah rekonstitusi yaitu terdeteksi sebesar 1.20 siklus log, namun jumlah tersebut masih di bawah dosis infeksi *E.sakazakii*. Tidak terdeteksinya bakteri pada saat rekonstitusi bisa jadi karena batas deteksi (*detection limit*) yang tinggi pada metode *plating*, sehingga

dapat dikatakan bahwa pada saat *hang time* jumlah bakteri sudah mencukupi sebagai jumlah minimum yang dapat dideteksi. Terjadinya pertumbuhan kembali bakteri ini setelah tidak dapat dideteksi saat direkonstitusi 70°C diduga karena pada saat direkonstitusi beberapa bakteri mengalami luka sub letal dan waktu 2 jam mencukupi untuk bakteri ini melakukan penyembuhan dan tumbuh kembali atau karena pada saat direkonstitusi jumlahnya berada di bawah *detection limit* maka setelah 8 jam jumlah isolat mulai dapat terdeteksi. Isolat yang pada saat direkonstitusi dengan 70°C masih dapat dideteksi mengalami peningkatan yang sesuai dengan jumlah bakteri tersisa pada 2, 4, dan 8 jam setelah rekonstitusi.



Gambar 7. Pertumbuhan *E. sakazakii* selama *hang time* untuk isolat yang tidak terdeteksi pasca rekonstitusi suhu 70°C

Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat bahwa waktu 2 jam setelah rekonstitusi menunjukkan jumlah yang telah mencapai dosis infeksi minimum dari *E. sakazakii* yaitu telah melebihi 3 log CFU/ml untuk isolat YR k2a dan YR w3 yaitu berturut-turut 3.31 dan 3.55 log CFU/ml. Isolat YR w3 tumbuh cepat pada 2 jam setelah rekonstitusi dan mencapai dosis infeksiya meskipun jumlah pada saat rekonstitusi masih di bawah dosis infeksiya. Isolat-isolat lainnya mencapai dosis infeksi minimum bakteri ini 4 jam setelah rekonstitusi dengan jumlah awal isolat setelah rekonstitusi antara 1 log hingga 3 log CFU/ml. ICMSF (2002) menetapkan bahwa waktu *hang time* maksimum dalam penyajian susu formula dan makanan bayi adalah 4 jam. Namun mengingat pada penelitian ini terdapat isolat yang tumbuh lebih cepat pada 2 jam *hang time* maka dalam penyajian susu formula pada skala rumah tangga disarankan agar menetapkan waktu *hang time* maksimum adalah 2 jam setelah rekonstitusi untuk mengurangi resiko infeksi *E. sakazakii*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Suhu rekonstitusi 4°C dan 40°C tidak memadai untuk digunakan sebagai suhu rekonstitusi susu formula dan makanan bayi dalam mengurangi risiko infeksi *E. sakazakii*.
2. Rekonstitusi dengan air bersuhu 100°C menyebabkan jumlah *E. sakazakii* tak terdeteksi lagi, namun suhu 100°C tidak

direkomendasikan sebagai suhu rekonstitusi mengingat rusaknya komponen gizi yang terdapat pada susu formula dan makanan bayi.

3. Suhu rekonstitusi 70°C dapat digunakan sebagai suhu untuk merekonstitusi susu formula dan makanan bayi, namun perlu diperhatikan kondisi penyimpanan susu formula atau makanan bayi yang telah dibuka kemasannya agar tidak terjadi kontaminasi silang sehingga jumlah awal *E. sakazakii* tidak mencapai 5 log CFU/ml mengingat ada beberapa isolat lokal *E. sakazakii* yang hanya mengalami sedikit penurunan bila direkonstitusi dengan suhu 70°C. Namun kondisi inokulum awal pada penelitian ini merupakan kondisi ekstrim yang sangat jarang terjadi.
4. Waktu *hang time* maksimum 2 jam setelah rekonstitusi dapat digunakan sebagai salah satu tindakan manajemen risiko *E. sakazakii* dalam skala rumah tangga mengingat terdapat isolat lokal *E. sakazakii* yang dapat tumbuh cepat pada 2 jam setelah rekonstitusi.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat berapa lama isolat *E. sakazakii* hasil isolasi ini dapat bertahan bila disimpan dalam kondisi kering selama beberapa waktu tertentu. Selain itu perlu dikembangkan analisis risiko terhadap *E. sakazakii* yang ada di Indonesia, untuk melihat karakteristik risiko terhadap bayi di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 2004. Background Information on *Enterobacter sakazakii* (*E.sakazakii*). International Association of Infant Food Manufacturer. [terhubung berkala]. <http://www.ifm.net/issues/esakazakii/background.htm>
- Edelson-Mammel, S. G., and R. L. Buchanan 2004. "Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula". *Journal of Food Protection*. 67:60-63.
- Estuningsih, Sri, C. Kress, A.A. Hassan, Ö. Akineden, E. Schneider, and E. Usleber. 2006. "*Enterobacteriaceae* in Dehydrated Powdered Infant Formula Manufactured in Indonesia and Malaysia". *Journal of Food Protection* 69: 3013-3017.
- Heuvelink, A.E., F.D. Kodde, J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, and E. de Boer. 2001. "*Enterobacter sakazakii* in Melkpoeder. Keuringsdiens van Waren Oost". Project number OT 0110.
- International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). 2002. Micro-organism in Foods, Vol 7. *Microbiological testing in food safety management*. Chapter 8. Selection of cases and attribute plans. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- Iversen, C. and S. Forsythe. 2003. "Risk Profile of *Enterobacter sakazakii*, An Emergent Pathogen Associated with Infant Milk Formula". *Trends in Food Science and Technology* 14 : 443 - 454.
- Lai, K.K. (2001). "*Enterobacter sakazakii* Infections Among Neonates, Infants, Children, and Adults: Case Reports and a Review of the Literature". *Medicine Baltimore* 80: 113 - 122.
- Li-Chun, L., Beuchat, R. Larry. 2007. Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Cereal as Affected by Composition, Reconstitution Liquid, and Storage Temperature. *Journal of Food Protection* 70: 1410 - 1422.
- Meutia, Y.R. 2008. *Enterobacter sakazakii* Isolat Asal Susu Formula dan Makanan Bayi: Karakterisasi Gen 16S rRNA dan Perilaku Bakteri Pasca Rekonstitusi. Thesis. Institut Pertanian Bogor.
- Muytjens, H.L., W.H. Roelofs, and G.H.J. Jaspard. 1988. "Quality of Powdered Substituted for Breast Milk with Regard to Members of the Family *Enterobacteriaceae*". *Journal of Clinical Microbiology* 26: 743 - 746.
- Nazarowec-White, M. and J.M. Farber. 1997. "Thermal Resistance of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Dried-Infant Formula". *Journal of Food Protection* 60: 226 - 230.
- Roitt, I.M. and P.J. Delves. 2001. *Essential of Immunology*. 3rd ed. Blackwell Science Ltd. Malden, USA.
- Simmons, B.P., M.S. Gelfand, M. Haas, L. Metts, and J. Ferguson. 1989. "*Enterobacter sakazakii* Infection in Neonates Associated with Intrinsic Contamination of a Powdered Infant Formula". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 10: 398 - 401.
- Van Acker, J., F.D. Smet, G. Muyltermans, A. Bouhgatef, A. Naessens, and S. Lauwers. 2001. "Outbreaks of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula". *Journal of Clinical Microbiology* 39: 293 - 297