

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Air susu ibu (ASI) memiliki peran proteksi terhadap berbagai jenis infeksi dan penyakit lainnya melalui komponen antimikroba, imunoglobulin, lisosim, laktoperoksidase, laktoferin, komponen komplemen, dan leukosit aktif. Tantangan masa kini, ibu tidak selalu dapat memberikan ASI secara menyusui langsung akibat beberapa kondisi antara lain bekerja, bayi sakit dan sedang menempuh pendidikan. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik Nasional tahun 2023 *Employment to Population Ratio* nasional sebesar 51,71% merupakan perempuan. Situasi tersebut menyebabkan ibu melakukan praktik pemberian ASI perah untuk dapat mempertahankan asupan dan produksi ASI selama ibu terpisah dengan anak sementara waktu.

Cara pemerah dan penyimpanan ASI yang tidak tepat dapat menjadi masalah karena susu merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme, sehingga meningkatkan risiko transmisi infeksi mikroba apabila praktik persiapan dan penyimpanannya tidak sesuai. Gransden *et al* melaporkan bahwa pompa ASI merupakan sumber penting kontaminasi bakteri pada ASI perah. Pertumbuhan bakteri pada suhu penyimpanan yang suboptimal (15-38°C) banyak didapatkan di negara berkembang dan di tempat kerja pada negara industri.

Selayaknya jaringan hidup dan cairan, ASI sangat sensitif terhadap perubahan suhu; beberapa komposisi nutrisi dan bioaktif dapat dipengaruhi oleh cara penyimpanan ASI. Praktik penyimpanan ASI di suhu ruang selama beberapa jam sering ditemukan di Indonesia. Selain bayi dari ibu pekerja, ASI perah juga dibutuhkan oleh bayi sakit yang dirawat di rumah sakit atau ruang rawat intensif.

Penelitian yang dilakukan oleh Paredes, S. M. R. (2019) didapatkan ASI yang diperah menggunakan alat pompa tidak steril memiliki pertumbuhan bakteri aerobik 5x lebih banyak, bakteri gram negatif 78x lebih banyak, dan

spesies *Streptococcus* 3,3 kali lebih banyak, dibandingkan yang dipompa dengan alat pompa steril.

Penelitian oleh Widjaja, N. A., dkk. (2019) yang membahas mengenai analisis mikrobiologi ASI mendapatkan adanya kontaminasi bakteri pada 0,67% sampel di jam ke-0, 76,67% sampel di jam ke-2, 83,33% sampel di jam ke-4, dan 100% sampel di jam ke-6. Pedoman *Academy of Breast-feeding Medicine* menyatakan bahwa ASI dapat bertahan pada suhu 6-8 jam di suhu ruang (25°C), namun belum ada pedoman khusus pada negara tropis, seperti Indonesia, khususnya Makassar dengan suhu ruang yang berbeda.

Proses sterilisasi pompa ASI dengan sterilisator pompa terstandarisasi belum dapat dipenuhi dan diakses oleh setiap ibu yang ingin memberikan ASI perah. Sehingga sebagian besar ibu masih memilih menggunakan proses sterilisasi sederhana berupa cuci dengan sabun, direndam dengan air panas, penguapan atau mengukus.

Penelitian ini dilakukan untuk menilai jumlah dan jenis mikroorganisme ASI perah yang disimpan di suhu ruang, termasuk jumlah pertumbuhan bakteri dan jenis mikroorganisme yang ditemukan, sebagai dasar rekomendasi sterilisasi dan penyimpanan yang sesuai dengan populasi di lingkungan negara tropis. Diharapkan dengan mengetahui jumlah dan jenis mikroorganisme yang terdapat pada ASI perah dapat mencegah penyakit akibat infeksi mikroorganisme pada bayi akibat pemberian ASI perah.

Saat ini belum ada penelitian mengenai perbedaan mikroorganisme pada ASI perah yang dipompa dengan alat tersterilisasi standar dan tersterilisasi ultraviolet. Belum ada *guideline* terkait durasi dan suhu penyimpanan ASI perah di Indonesia yang merupakan negara tropis. Hanya terdapat satu penelitian serupa yang dilakukan di Indonesia mengenai pertumbuhan mikroorganisme pada ASI perah di suhu ruang yang dilakukan di Surabaya pada tahun 2019 dan belum pernah dilakukan sebelumnya di Makassar.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan mikroorganisme antara ASI perah menggunakan pompa ASI dengan sterilisasi terstandar dan pompa ASI dengan proses sterilisasi ultraviolet yang disimpan pada suhu ruang daerah tropis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan antara mikroorganisme ASI perah menggunakan pompa ASI dengan sterilisasi terstandar dan pompa ASI dengan proses sterilisasi ultraviolet yang disimpan pada suhu ruang daerah tropis.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain:

1. Membandingkan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah pada 0 jam dan 3 jam dengan pompa sterilisasi terstandar.
2. Membandingkan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah pada 0 jam dan 3 jam dengan pompa sterilisasi ultraviolet,
3. Membandingkan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah pada 0 jam antara pompa sterilisasi terstandar dan pompa sterilisasi ultraviolet.
4. Membandingkan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah pada 3 jam antara pompa sterilisasi terstandar dan pompa sterilisasi ultraviolet.
5. Membandingkan jumlah mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah pada 3 jam antara pompa sterilisasi terstandar dan pompa sterilisasi ultraviolet.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat dalam bidang akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menguatkan wawasan keilmuan mengenai perbedaan pertumbuhan mikroorganisme pada ASI yang diperah dengan pompa disterilisasi terstandar dan pompa disterilisasi ultraviolet yang disimpan di suhu ruang dan dapat dijadikan acuan dalam penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis dan jumlah mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah yang disimpan di suhu ruang daerah tropis.

1.4.2 Manfaat praktis

Pengetahuan tentang perbedaan pertumbuhan mikroorganisme pada ASI perah dapat membantu klinisi dalam mengedukasi ibu menyusui mengenai praktik pemerahan ASI yang ideal dan durasi penyimpanan ASI perah yang aman di suhu ruang daerah tropis.

1.5 Hipotesis penelitian

1. Terdapat perbedaan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah di 0 jam dan 3 jam dengan pompa disterilisasi terstandar.
2. Terdapat perbedaan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah di di 0 jam dan 3 jam dengan pompa disterilisasi ultraviolet,
3. Terdapat perbedaan jenis mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah di 0 jam dan 3 jam antara pompa disterilisasi terstandar dan pompa disterilisasi ultraviolet.
4. Terdapat perbedaan jumlah mikroorganisme yang tumbuh pada ASI perah di 0 jam dan 3 jam antara pompa disterilisasi terstandar dan pompa disterilisasi ultraviolet.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pendahuluan

Air Susu Ibu (ASI) eksklusif adalah air susu ibu yang diberikan kepada bayi sampai bayi berusia 6 bulan tanpa diberikan makanan dan minuman, kecuali obat dan vitamin. Hak untuk mendapatkan ASI tercantum dalam UU No. 36 tahun 2009 pasal 128 ayat 1 yang berisi bahwa setiap bayi berhak mendapatkan air susu ibu eksklusif sejak dilahirkan selama 6 (enam) bulan, kecuali atas indikasi medis.^{1,2}

ASI memiliki peran protektif terhadap berbagai penyakit infeksi dan penyakit lainnya, terutama di negara berkembang, karena kandungan antimikroba dan zat imunologis lainnya seperti imunoglobulin, lisozim, *laktoperoksidase*, laktoferin, komponen komplemen dan leukosit aktif.^{2,3}

Ibu tidak selalu dapat menyusui bayinya secara langsung karena beberapa alasan seperti bekerja atau sekolah. Keadaan ini membuat ibu untuk mengeluarkan ASI perah yang selama ini dianjurkan sebagai cara yang efektif untuk mendorong dan mempertahankan laktasi ketika ibu terpisah dari bayinya untuk sementara waktu.^{2,3}

Susu adalah salah satu media yang baik untuk pertumbuhan banyak mikroorganisme, sehingga memungkinkan transmisi infeksi mikroba jika tidak dikumpulkan, diproses, dan disimpan dengan benar. Pertumbuhan bakteri sering ditemukan meningkat pada suhu penyimpanan sub-optimal (suhu 15-38°C) di negara berkembang serta di tempat kerja di negara industri.^{2,3}

Seperti jaringan hidup dan cairan lainnya, ASI sangat sensitif terhadap perubahan suhu, dan beberapa kandungan nutrisi dan bioaktif mungkin terpengaruh oleh proses penyimpanan. Penyimpanan ASI perah dalam suhu ruang beberapa jam sebelum dikonsumsi banyak ditemukan di Indonesia. Berdasarkan pedoman *World Health Organization* (WHO), ASI perah dapat bertahan selama 6 hingga 8 jam dalam suhu ruangan. Namun saat ini belum ada kajian penilaian mikrobiologi dalam ASI perah pada suhu ruangan di negara tropis di Indonesia, khususnya di

tempat penelitian (Makassar) dengan suhu ruangan rata-rata 27-32 derajat celcius.^{2,3}

Berdasarkan penjelasan di atas, maka penulis menyusun penelitian ini untuk menambah pengetahuan dan wawasan tentang mikroorganisme yang bertumbuh dalam ASI selama penyimpanan di suhu ruangan daerah tropis.

2.2 Bakteri Dalam ASI pada Suhu Ruangan

Terdapat beberapa informasi tentang persiapan ASI perah yang aman secara mikrobiologis yang dianggap dapat diterima: bakteri mesofilik kurang dari 10⁴ CFU/ml, dengan jumlah total enterobakteri kurang dari 10⁵ CFU/ml, dan tidak ada bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter sakazakii*, (β -hemolitik) *Streptococcus pyrogenes*, spesies *Pseudomonas*, *Proteus* dan *Salmonella*.^{2,3}

Temuan yang dicapai dalam penelitian menunjukkan bahwa setelah 2 jam terpapar pada suhu ruangan terbuka, sekitar 76.67% sampel ASI perah telah terkontaminasi (jumlah koloni > 10⁴ cfu/ml) dan terdapat beberapa patogen (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* dan *Klebsiella pneumoniae*) sehingga sampel ASI perah tersebut tidak aman untuk diberikan kepada bayi. Penelitian yang dilakukan oleh Karimi *et al* mengungkapkan bahwa sekitar 85% sampel ASI yang dikumpulkan dari *Neonatal Intensive Care Unit* (NICU) terinfeksi oleh bakteri dan genus yang dominan adalah *Klebsiella*.^{2,3}

Penelitian telah menunjukkan bahwa metode terbaik untuk menyimpan ASI perah adalah di lemari es pada suhu 4°C, terutama di iklim panas. Penelitian lain yang telah dilakukan pada kondisi penyimpanan yang optimal mencatat bahwa ASI perah dapat bertahan hingga 3-8 hari di dalam lemari es. Indonesia merupakan negara tropis dengan dua musim sepanjang tahun (musim panas dan musim hujan) dengan suhu ekstrim antara dua musim (30-37°C di musim panas dan 27-28°C di musim hujan).^{2,3}

Igbogboja *et al* menyatakan bahwa banyak ibu tidak memberikan ASI perah karena menganggap ASI perah tidak aman diberikan kepada bayi setelah lebih dari 8 jam penyimpanan. Penelitian lebih lanjut menjelaskan bahwa ASI perah akan

sangat mudah terkontaminasi oleh bakteri, toksin, dan dapat mengalami dilusi dan menjadi asam setelah disimpan. Penelitian tentang perbedaan waktu penyimpanan dapat menyebabkan banyak perubahan terkait kandungan nutrisi dalam ASI.^{2,3}

ASI yang baru dikumpulkan jarang yang steril dan biasanya mengandung bakteri yang berasal dari mikroflora kulit dan *nipple duct* ibu, tetapi juga mengandung patogen potensial. Penelitian yang dilakukan oleh Boo *et al* menegaskan bahwa ekspresi manual (menggunakan tangan) memiliki risiko kontaminasi yang lebih rendah daripada ASI yang diperah menggunakan pompa ASI.^{2,3}

Telah diketahui bahwa perbedaan lokasi geografis dan waktu serta metode pengumpulan susu mempengaruhi hasil analisis mikrobiota dalam ASI. Fitzstevens *et al* menyebutkan bahwa dua genera, *Streptococcus* dan *Staphylococcus*, mungkin secara universal dominan dalam ASI, terlepas dari perbedaan lokasi geografis atau metode analisis. Terdapat empat spesies yang diisolasi: *Staphylococcus coagulase*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus faecalis*. Mense *et al* mengamati kontaminasi bakteri dalam ASI yang diekstraksi secara mekanis pada 50 ibu, termasuk spesies *Staphylococcus coagulase*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Streptococcus faecalis*. Spesies lainnya adalah *Staphylococcus aureus*, *Alpha-hemolytic Streptococcus* dan bakteri dermal.^{2,3}

Penelitian yang dilakukan oleh Widjaya dkk di Surabaya pada tahun 2019 mendapatkan *Coagulase-negative Staphylococcus* (CNS) spesies yang dominan, terdapat pada semua sampel ASI perah, karena spesies ini merupakan organisme dominan pada flora kulit normal dan paling sering diisolasi dari kultur darah. Delgado *et al* menyatakan bahwa gangguan keseimbangan flora bakteri normal dalam ASI dapat menyebabkan pertumbuhan berlebih CNS dan menyebabkan mastitis.^{2,3}

Diperkirakan sekitar 8% infeksi nosokomial yang terjadi pada pasien di NICU disebabkan oleh *Klebsiella pneumoniae* (KLP). Dorota *et al* mengamati bayi baru lahir dengan infeksi berulang dan didapatkan sumber infeksi adalah ASI yang terkontaminasi dengan *Klebsiella pneumoniae*.^{2,3}

Adanya *Escherichia coli* pada sampel ASI perah menunjukkan bahwa kontaminasi oleh mikroorganisme *coliform* dapat berasal dari lingkungan, yang berarti rendahnya tingkat higienitas dan sanitasi. Di antara enterobacteria, *coliform* telah dipilih sebagai kontrol bakteriologis yang sangat penting dari ASI perah, karena adanya *coliform* dapat mengindikasikan kontaminasi feses, bahkan jika itu berasal dari sumber tidak langsung. Penelitian lain menemukan *Escherichia coli* pada 8.5% dari 59 sampel ASI dan 2% dari 44 sampel ASI.^{2,3}

ASI memiliki titer aglutinasi yang tinggi terhadap berbagai serotipe *E. coli*. Lorico *et al* mengamati aktivitas inhibisi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus* dalam ASI perah dan menyatakan bahwa ASI menunjukkan sifat bakteriostatik terhadap sebagian besar patogen kecuali *Escherichia coli* setelah dibekukan selama 24 jam.^{2,3}

Bank ASI biasanya menyimpan ASI secara aerobik pada suhu 20°C untuk meminimalkan atau mencegah degradasi biologis dan kimia, setelah *pasteurization batch* dilakukan. Tindakan ini kemungkinan menonaktifkan sebagian besar mikroba pembentuk non-spora yang ada dalam ASI. Penelitian sebelumnya mengamati dampak yang berbeda dari proses pembekuan ASI pada komposisi mikrobiota. Dalam penelitian ini, peneliti menyelidiki mikroba dalam ASI, menggunakan kombinasi metode *cultivation-dependent* dan *cultivation-independent*, dan juga menentukan dampak yang terjadi akibat penyimpanan ASI selama 6 hari pada suhu 4°C. Sampel ASI disimpan dalam kondisi anaerobik sebagai prosedur domestik umum untuk proses penyimpanan ASI pada suhu 4°C atau proses penyimpanan ASI pada suhu 20°C. Hal ini kemungkinan dapat menyebabkan oksigenasi susu, tergantung pada *handling* dan *packaging*. Kondisi ini dapat menghambat mikroba ASI, terutama mikroba anaerob, yang mungkin berperan dalam proses kolonisasi pada saluran pencernaan neonatus.^{4,5}

Jumlah *viable bacterial load* dalam ASI yang ditentukan menggunakan *plate count* dilaporkan dalam kisaran 1.2 hingga 5.5 log CFU/ml dalam ASI ibu Afrika Selatan (n = 55), antara log 2 dan 6 pada ASI (n = 12) dari bayi prematur dan < log 4.4 CFU/ml dalam ASI ibu Swiss (n = 7). Jumlah sel bakteri yang

recovery tergantung pada jenis media budidaya yang digunakan dan pada kondisi budidaya.^{4,5}

Nilai yang bervariasi dilaporkan untuk jumlah *bacterial load* dalam ASI tergantung pada metodologi yang diterapkan. Kuantifikasi *sequence* gen rRNA 16S menunjukkan *bacterial load* hingga 10^{6-7} sel/ml ASI setelah mengoreksi beberapa koping dari gen rRNA 16S per sel, yang rata-rata sekitar log 1 sel/ml lebih tinggi daripada yang diuji dengan *cultivation-based*. Hal ini dapat dijelaskan dengan *incomplete recovery* dari semua mikroba yang hidup dengan kultur dan/atau dengan deteksi material gen rRNA 16S dari sel yang sudah mati atau lisis. Selama kultivasi, bakteri dapat tumbuh langsung pada sumber gula yang ada dalam media, atau pada metabolit antara yang dihasilkan oleh mikroba lain dalam pemberian *cross-feeding*. Misalnya, hanya sebagian kecil mikroba spesial yang diadaptasi untuk mendegradasi polimer musin kompleks dan meskipun demikian kami memperoleh jumlah sel yang tinggi ketika musin diberikan sebagai satu-satunya sumber karbohidrat. Juga menunjukkan sebelumnya bahwa mikroba usus bayi dapat membentuk jaringan trofik dari musin untuk menghasilkan *short chain fatty acid* (SCFA).^{4,5}

Dengan menggunakan kombinasi *culture-dependent approach* dan *culture-independent approach*, didapatkan sub-populasi mikroba yang berbeda dalam sampel ASI yang menunjukkan variabilitas mikrobiota ASI antar-individu yang tinggi. Data tersebut sesuai dengan penelitian *culture-independent* sebelumnya menggunakan *amplicon sequencing* gen rRNA 16S yang mengidentifikasi berbagai anggota *Firmicutes* dan *Proteobacteria* pada proporsi yang berbeda di antara individu dalam penelitian. Peneliti juga berusaha menentukan komposisi mikrobiota menggunakan *amplicon sequencing* rRNA 16S. Namun, seperti yang dilaporkan oleh Sakwinska *et al* dan Simpson *et al* bahwa *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pertama gagal menghasilkan produk PCR yang dapat diukur, kemungkinan jumlah bakteri dalam sampel ASI berada pada atau di bawah batas log 6 *copies/ml*. Beberapa sampel tetap dilakukan *sequencing*, tetapi tidak menghasilkan bacaan yang cukup. Kemudian diujikan *nested PCR approach* yang mirip dengan penelitian oleh Boix-Amorós *et al* untuk terlebih dahulu memperkaya

target amplicon, namun, pendekatan ini menghasilkan proporsi yang tinggi (13-70%) dari pembacaan yang tidak terklasifikasi bahkan pada filum yang kemungkinan disebabkan oleh jumlah sel awal yang rendah dan amplifikasi yang berlebihan karena *nested PCR approach*.^{4,5}

Penelitian ini tidak membudidayakan *Bifidobacterium* atau mengamplifikasi gen rRNA 16S *Bifidobacterium* menggunakan qPCR dari sampel ASI segar dan yang disimpan sementara jumlah populasi yang rendah terdeteksi dalam sampel *most probable number* (MPN) menggunakan *sequencing* gen rRNA 16S. Penelitian sebelumnya melaporkan isolasi bifidobacteria. Namun, frekuensi isolasi bervariasi antara 6 dan 35% dari donor. *Bifidobacterium* juga tidak terdeteksi dalam ASI ketika metagenomics digunakan, menunjukkan bahwa *Bifidobacterium* spp adalah komponen variabel mikrobiota dalam ASI, atau tidak dapat dideteksi dengan mudah dengan metode yang diterapkan. *Bifidobacterium* spp disarankan sebagai organisme indikator yang memberikan bukti adanya *entero-mammary pathway* karena strain identik telah diisolasi dari pasangan ibu dan bayi.^{4,5}

Analisis gen rRNA 16S berdasarkan *culture-dependent approach* sering tetapi tidak selalu menunjukkan adanya bakteri anaerob seperti *Clostridiales*, dan *Bacteroidetes* dalam sampel ASI. Didapatkan gen rRNA 16S dari *Clostridiales* dan *Bacteroidetes* dalam ASI segar dan ASI yang disimpan. Setelah penyimpanan anaerobik, prevalensi *Bacteroidetes* meningkat 3 kali lipat sementara prevalensi *Clostridium* kluster IV dan XIVa dari *Clostridiales* meningkat dalam jumlah besar atau menjadi terdeteksi dalam tujuh sampel, menunjukkan bahwa (1) bakteri anaerob yang viabel ditemukan dalam ASI meskipun memiliki jumlah yang rendah, dan (2) penyimpanan anaerobik ASI pada suhu 4°C dapat mendorong pertumbuhan beberapa bakteri anaerob.^{4,5}

Hasil analisa *bacterial load* menunjukkan terdapat bakteri pada ASI perah sebelum penyimpanan, dan terjadi perubahan penurunan pada ASI perah yang disimpan di *cooler bag* dan dipasteurisasi. Total bakteri pada ASI perah segar menunjukkan jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan ASI perah yang disimpan di cooler bag dan yang dipasteurisasi. ASI perah termasuk salah satu bahan yang sangat mudah ditumbuhi bakteri karena komposisi gizi antara protein

dan lemak yang cukup tinggi dan hal tersebut sangat menguntungkan untuk pertumbuhan mikroorganisme.^{1,2}

Perubahan *bacterial load* tersebut berkaitan dengan fase pertumbuhan mikroorganisme. Beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan pertumbuhan mikroorganisme adalah ketersediaan nutrient, keasaman, suhu dan kelembababan udara. Pada fase ini bakteri lebih banyak memerlukan energi dibanding dengan fase lainnya.^{1,2}

ASI perah lebih sering disimpan di lemari es oleh lebih dari setengah (52%) dari total ibu. Lainnya menyimpan ASI perah dengan cara merendam wadah ASI ke dalam air dingin (37.8%) atau pada suhu ruangan (30°C) (10,2%). Penelitian telah menunjukkan bahwa metode terbaik untuk menyimpan ASI perah adalah di lemari es (pada suhu 4°C) terutama di iklim panas. Penelitian lain telah dilakukan di bawah kondisi penyimpanan yang optimal dan peneliti menemukan bahwa ASI perah dapat bertahan hingga 3-8 hari di lemari es.^{3,4}

Hasil penelitian terkait *bacterial load revealed* menunjukkan bahwa pada sampel ASI yang dianalisis segera (0 jam) tidak didapatkan adanya pertumbuhan bakteri di semua media yang digunakan serta di bawah dua kondisi penyimpanan. Setelah penyimpanan selama 3 jam, pertumbuhan bakteri terlihat pada sampel yang disimpan pada suhu ruangan (30°C), sedangkan sampel yang direndam dalam wadah berisi air (26°C) tidak didapatkan adanya bakteri yang tumbuh pada ketiga media yang digunakan. Namun, setelah penyimpanan selama 6 jam dan 9 jam, pertumbuhan bakteri terlihat jelas pada semua sampel pada media yang berbeda pada kedua kondisi penyimpanan. Sampel ASI yang disimpan pada suhu ruangan (30°C) memiliki jumlah bakteri berkisar antara 0.00 ± 0.00 hingga $22.5 \pm 3.2 \times 10^2$ CFU/ml dan sampel ASI yang direndam dalam air (26°C) memiliki jumlah bakteri berkisar antara 0.00 ± 0.00 hingga $7.8 \pm 5.6 \times 10^2$ CFU/ml. Jumlah bakteri secara signifikan lebih rendah dalam sampel ASI yang direndam dalam wadah air ($P < 0.05$) dibandingkan pada suhu ruangan. Hal ini menunjukkan bahwa penyimpanan sampel ASI pada kedua kondisi tersebut baik, tetapi perendaman dalam wadah berisi air dingin (26°C) dapat mengurangi pertumbuhan bakteri. Dengan demikian kemungkinan air yang digunakan untuk penyimpanan memiliki kemampuan untuk

menghambat pertumbuhan bakteri dalam 3 jam pertama penyimpanan. Hal ini membantu untuk menunda atau mengurangi pertumbuhan bakteri dalam sampel ASI. Demikian pula, Nwankwo *et al.* melaporkan bahwa penyimpanan sampel ASI pada suhu ruangan akan menjadi praktis bagi wanita menyusui yang tidak memiliki lemari es, sementara Barger and Bull melaporkan bahwa hal itu akan memberikan alternatif lain untuk menyimpan ASI pada suhu ruangan, setidaknya untuk jangka waktu yang terbatas.^{3,5}

Jumlah bakteri lebih dari 10^4 CFU/ml dianggap *unacceptable* dalam ASI. Berdasarkan hal tersebut, kadar yang diperoleh dalam penelitian ini setelah 9 jam penyimpanan berada dalam kisaran yang *acceptable* dalam ASI. Hal ini menyiratkan bahwa ASI dapat disimpan dengan aman hingga 9 jam. Selain itu, Moulin *et al* juga mengamati dalam penelitiannya bahwa ASI yang tidak diproses yang disimpan pada suhu ruangan dapat digunakan dengan aman setelah 9 jam penyimpanan. Igumbor *et al* dalam penelitian yang dilakukan di Zimbabwe mencatat jumlah koloni kurang dari 200 CFU/ml untuk sampel ASI yang disimpan pada suhu ruangan (15-27°C) selama 8 jam. Hal ini, bagaimanapun, lebih tinggi dari nilai yang diperoleh dalam penelitian ini. Koloni bakteri yang diperoleh Ajusi *et al* tergolong rendah (berkisar dari $0.15 - 23.1 \times 10^3$ CFU/ml dengan rata-rata 5.54×10^3 CFU/ml). Nilai rata-rata mereka, bagaimanapun, lebih tinggi dari nilai yang diperoleh dalam penelitian ini.^{3,6}

Beberapa patogen potensial seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus faecalis* isolated dari sampel ASI, meskipun kadarnya lebih rendah dari yang direkomendasikan dalam ASI ($<10^4$ CFU/ml). Organisme *isolated* merupakan indikasi kontaminasi feses. Sebuah penelitian yang dilakukan pada ASI perah yang disimpan di bank susu mencatat pertumbuhan bakteri dengan organisme seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dikaitkan dengan manajemen ASI yang salah. Demikian pula, penelitian lain juga menyebutkan bahwa mikroorganisme patogen dalam ASI, seperti *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (6,7%) dan *Enterococcus faecalis* (13,6%), tetapi ditemukan dalam jumlah kecil dalam sampel ASI yang mereka analisis. Dalam penelitian lain yang dilakukan di Nigeria yang mengamati pertumbuhan bakteri

dalam ASI perah yang disimpan pada suhu ruangan (27-32°C) selama 24 jam, didapatkan adanya bakteri *isolated* yang mewakili flora kulit normal. Penelitian lebih lanjut mencatat bahwa pada suhu ruangan, ASI dapat disimpan selama 6 jam tanpa peningkatan jumlah bakteri yang signifikan, sementara penelitian lain menyarankan penyimpanan maksimal 4 jam pada iklim panas (30-38°C). Namun sampel ASI yang direndam dalam wadah berisi air pada penelitian ini mampu bertahan hingga 3 jam, sebelum pertumbuhan mikroba terdeteksi.^{3,4}

Suhu sangat mempengaruhi stabilitas nutrisi yang ada di dalam ASI yang disimpan. Pada suhu refrigerasi yaitu antara suhu 2-8°C hanya dapat memperlambat degradasi nutrisi ASI dan membatasi pertumbuhan mikroba untuk waktu yang singkat saja. Pada suhu dingin (refrigerasi) dapat berkembang mikroba yang dikatakan sebagai psikotropik, umumnya non-patogen, tetapi dapat merusak ASI selama penyimpanan jangka waktu yang lama.^{5,6}

Pada penelitian ini penyimpanan ASI pada suhu -20°C lebih baik daripada suhu 4°C. Suhu penyimpanan ASI yang lebih hangat dikaitkan dengan jumlah mikrobiota yang tumbuh lebih cepat. ASI yang diperah dapat mengandung mikrobiota yang berasal dari kulit ibu dan *nipple duct* payudara, terkadang juga dapat mengandung patogen potensial. Oleh sebab itu kontaminasi bakteri pada saat proses pengeluaran ASI sebaiknya dihindari.^{5,7}

Selama ASI disimpan di dalam lemari pendingin, mikrobiota yang ada di dalam ASI melakukan metabolisme untuk menghasilkan energi yang berguna untuk kelangsungan hidup mikrobiota. Proses metabolisme mikrobiota ini memerlukan nutrisi yang berasal dari lingkungannya dalam hal ini adalah protein, lemak dan karbohidrat. Nutrisi ASI yang kaya akan karbohidrat, protein, lemak yang merupakan medium dalam pertumbuhan mikrobiota. Bakteri akan mengeluarkan enzim protease, lipase dan betagalaktosidase untuk mencerna nutrisi pada ASI. Enzim lipase, protease dan dekarboksilase yang dihasilkan oleh beberapa bakteri di dalam ASI yang disimpan dapat menyebabkan kerusakan protein anti mikroba atau mengubah asam amino bebas menjadi amina toksik. Laktoferin merupakan komponen bioaktif tersusun oleh protein. Pada penyimpanan ASI, laktoferin

digunakan oleh mikrobiota dalam proses metabolisme sehingga selama penyimpanan kadar laktoferin akan berkurang.^{5,6}

Lisozim merupakan enzim utama yang terdapat pada ASI memiliki efek antibakteri yang berguna bagi bayi. Struktur enzim lisozim adalah protein. Pada ASI yang telah disimpan dilemari pendingin, terjadi pertumbuhan bakteri asam laktat. Untuk mempertahankan hidupnya, bakteri asam laktat akan menggunakan nutrisi yang ada pada ASI yaitu protein, karbohidrat dan lemak. Hal ini akan berdampak pada turunnya kadar protein, lemak dan karbohidrat ASI serta penurunan kualitas gizi yang lainnya yang terkandung di dalam ASI.^{4,5}

ASI mengandung bermacam-macam unsur dan sebagian besar terdiri dari zat makanan yang juga diperlukan bagi pertumbuhan bakteri. Oleh karenanya pertumbuhan bakteri dalam ASI sangat cepat pada suhu yang sesuai. ASI dapat mengandung mikroorganisme yang berasal dari lubang diujung puting yang tidak tertutup dan biasanya basah, dan telah diketahui bahwa bakteri dapat tumbuh sedikit agak jauh ke dalam puting. Ketika ASI ini diambil mikroorganisme ini terbawa dan dengan demikian menjadi sumber pencemaran yang lain.^{5,7}

Tumbuhnya mikroorganisme dalam ASI dapat menimbulkan suatu kerugian dalam mutu ASI. Beberapa kerusakan pada ASI yang disebabkan karena tumbuhnya mikroorganisme antara lain adalah; pengasaman dan penggumpalan yang disebabkan karena fermentasi laktosa menjadi asam laktat yang menyebabkan turunnya pH dan juga dapat menyebabkan terjadinya penggumpalan casein; berlendir seperti tali yang disebabkan karena terjadinya pengentalan dan pembentukan lendir sebagai akibat pengeluaran bahan seperti kapsul dan bergetah oleh beberapa jenis bakteri; penggumpalan ASI yang timbul tanpa penurunan pH. Hal ini disebabkan oleh bakteri yang menghasilkan enzim yang mencerna lapisan tipis fosfolipid di sekitar butirbutir lemak dan dengan demikian kemungkinan butir-butir itu menyatu membentuk suatu gumpalan yang timbul ke permukaan ASI.^{5,6}

Data penelitian ini menunjukkan kadar lisozim ASI yang disimpan pada suhu -20°C tidak berbeda secara signifikan dibandingkan dengan ASI segar. Penyimpanan ASI pada suhu -20°C menunjukkan ketahanan terhadap kerusakan kadar lisozim. Hal ini disebabkan oleh semakin rendah suhu penyimpanan ASI

maka pertumbuhan mikroba semakin lambat. Sehingga bakteri yang menggunakan lisozim sebagai sumber energi lebih sedikit.^{5,6}

Pada penelitian lain, disebutkan bahwa sebanyak 10 famili bakteri yang paling banyak terdeteksi, yaitu *Streptococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Sinobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Micrococcaceae*, dan *Comamonadaceae*. Hasil ini umumnya konsisten dengan penelitian sebelumnya. Kumar *et al* melaporkan bahwa lokasi geografis secara langsung mempengaruhi mikrobiota dan asam lemak dalam sampel ASI dari populasi ibu menyusui di Cina, Finlandia, Afrika Selatan, dan Spanyol. Peneliti mengamati perbedaan yang signifikan dalam komposisi mikroba di antara sampel yang dikumpulkan dari berbagai daerah. Mikrobiota dari seluruh sampel diklasifikasikan menjadi tiga klaster, yaitu *Staphylococcaceae* (pada klaster 1 sebanyak 42.1%), *Streptococcaceae* (pada klaster 2 sebanyak 48.5%), atau *Pseudomonadaceae* (pada klaster 3 sebanyak 26.5%). Pada klaster 1, *Staphylococcaceae* dan *Lactobacillaceae* membentuk lebih dari setengah (52.0%) dari total mikrobiota dalam ASI.^{6,7}

Dengan menggunakan metode *microbial network analysis*, Ma *et al* menemukan interaksi dalam mikrobiota ASI: Mikrobiota terbanyak dalam ASI yang ditemukan meliputi *Staphylococcus* gram positif dan *Corynebacterium* berkorelasi negatif dengan *Bradyrhizobium* gram negatif, *Pseudomonas*, dan *Sphingomonas*. *Propionibacterium* gram positif berkorelasi positif dengan *Pseudomonas* gram negatif, *Ralstonia*, *Serratia*, dan *Sphingomonas*. Dalam *network analysis*, ditemukan bahwa *Staphylococcus* gram positif, *Streptococcus*, dan *Rothia* berkorelasi negatif secara beragam dengan *Acinetobacter* gram negatif, *Bacteroides*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, dan *Pseudomonas*.^{5,6}

Berbagai macam bakteri gram negatif terkait kulit dan enterik yang diamati dalam sampel ASI merupakan patogen oportunistik potensial; namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pertumbuhan ini ditekan oleh bakteri gram positif seperti *Staphylococcus* dan *Rothia*. Secara khusus, *Staphylococcus* (dominan di Klaster 1) mungkin menjadi faktor penting terkait interaksi mikroba.⁶

Sakwinska *et al* menganalisis mikrobiota dalam ASI dari ibu yang tinggal di Cina dan menemukan perbedaan antara sampel yang dikumpulkan dengan menggunakan protokol standar dengan dan tanpa tindakan aseptik. Mikrobiota ASI didominasi oleh *Streptokokus* dan *Stafilokokus*; Namun, *Acinetobacter* sp dominan pada *high abundance* (30%) ketika protokol pengumpulan standar tanpa tindakan aseptik payudara. Sampel susu yang dianalisis dikumpulkan melalui berbagai tahap laktasi (0.1-21.7 bulan; rata-rata 6.1 ± 4.0 bulan setelah melahirkan), dan lima *Acinetobacter* sp terdeteksi, tetapi jumlah keseluruhan *Acinetobacter* sangat rendah (1.5%). Oleh karena itu, *Acinetobacter* berkorelasi negatif tidak hanya dengan *Staphylococcus* yang dominan, tetapi juga dengan penggunaan protokol aseptik untuk pengumpulan susu.^{6,7}

Penelitian sebelumnya telah mengungkapkan bahwa keragaman bakteri dalam ASI berubah sesuai dengan tahap laktasi, dari kolostrum ke ASI transisi ke ASI matur. Boix-Amorós *et al* menegaskan bahwa mikrobiota bakteri dalam susu berubah seiring dengan tahap laktasi yang berbeda: yang paling umum genus dalam kolostrum adalah *Staphylococcus*, diikuti oleh *Acinetobacter*; *Pseudomonas*; dan *Streptococcus* dalam ASI transisi; dan *Acinetobacter* dalam sampel ASI matur. Namun, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan terkait jumlah 17 famili bakteri paling banyak di antara sampel yang dikumpulkan dalam tiga tahap laktasi yang berbeda (kurang dari 3 bulan, 3-6 bulan, dan lebih dari 6 bulan).^{5,6}

Penelitian sebelumnya telah menyelidiki apakah cara persalinan (persalinan pervaginam vs C-section) mempengaruhi profil mikrobiota dalam ASI. Jumlah yang lebih tinggi dari *Leuconostocaceae* (genus dominan: *Leuconostoc*) dan jumlah yang lebih rendah dari *Carnobacteriaceae* (*Carnobacterium*) dan *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*) telah diamati pada sampel dari ibu yang melahirkan pervaginam daripada sampel dari ibu yang melahirkan melalui C-section. Keragaman dan jumlah bakteri yang lebih besar (khususnya, lebih banyak *Bifidobacterium* sp) telah ditemukan pada sampel dari ibu yang melahirkan melalui C-section dan spesies *Staphylococcus* yang lebih sedikit pada sampel dari ibu yang melahirkan pervaginam. Kumar *et al* juga menganalisis mikrobiota dalam sampel ASI dari wanita yang tinggal di Spanyol, Finlandia, Cina, dan Afrika Selatan yang

melahirkan pervaginam atau *C-section*; mereka mengamati perbedaan yang signifikan dalam profil mikroba ASI antara dua kelompok tersebut. Sebaliknya, Sakwinska *et al* dan Urbaniak *et al* mengamati tidak ada perbedaan dalam profil mikroba antara sampel dari ibu yang melahirkan pervaginam dan mereka yang melahirkan melalui *C-section*. Namun, hasil ini didasarkan pada analisis skala kecil. Meskipun tidak ditemukan perbedaan yang signifikan dalam komponen mikroba dominan dalam susu, jumlah *Lactobacillus* secara signifikan lebih tinggi ($P < 0.05$) setelah *C-section* daripada setelah persalinan pervaginam. Selain itu, diamati jumlah *unique* OTU yang lebih besar secara signifikan ($P < 0.001$) dalam mikrobiota ASI ibu yang melahirkan melalui *C-section* daripada mikrobiota ASI dari ibu yang melahirkan pervaginam; namun, tidak ada perbedaan signifikan yang ditemukan dalam perbandingan keragaman alfa antara kedua kelompok ini.⁶

Penelitian lain menyebutkan bahwa *cold storage* menyebabkan pengurangan yang signifikan dalam jumlah total DNA dari sel yang hidup yang menunjukkan bahwa sel manusia dan/atau bakteri dalam ASI hilang selama penyimpanan dalam *cold storage*. Zonneveld *et al* melaporkan bahwa penyimpanan ASI selama 2 jam pada suhu 37°C, suhu ruangan, suhu 4°C, atau suhu 80°C mengakibatkan penurunan yang signifikan dalam viabilitas sel. Hasil ini juga mendukung temuan Arahbi *et al* yang menunjukkan penurunan yang signifikan dalam jumlah total bakteri setelah 1, 3, 6, dan 9 bulan penyimpanan pada suhu 20°C. Secara kolektif, data yang tersedia menunjukkan bahwa kelangsungan hidup sel manusia dan bakteri dipengaruhi oleh suhu penyimpanan baik penyimpanan dalam *warm storage* dan *cold storage*.⁷

Dalam sebuah penelitian disebutkan bahwa mayoritas (89.8%) sampel ASI perah terkontaminasi dengan pertumbuhan bakteri. Organisme yang paling sering diisolasi termasuk *Staphylococcus aureus* (55.7%), *Staphylococcus epidermidis* (21.7%) dan *Enterobacter* (11,6%). Sebagai perbandingan, Karimi *et al* menemukan bahwa 85% sampel terinfeksi, dan mikroorganisme yang dominan adalah *Klebsiella* (13.7%) diikuti oleh *S. epidermidis* (12.5%). Dalam penelitian lain, pengujian mikrobiologi ASI perah mengidentifikasi pertumbuhan bakteri pada 75% sampel. Tingkat kontaminasi ASI perah yang relatif tinggi dalam penelitian

ini dikaitkan dengan berbagai kesenjangan dalam proses *milk expression*, penyimpanan ASI, dan transportasi ASI. Faktor penting lainnya yang dapat berkontribusi pada tingginya tingkat ASI perah adalah cuaca yang relatif panas dan lembab di Mesir pada sebagian besar bulan dalam setahun.^{7,8}

Sebagai catatan, *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) adalah organisme *isolated* yang paling tidak lazim dalam kelompok penelitian. Behari *et al* menemukan bahwa MRSA dapat ditularkan dari ibu ke bayi prematur melalui ASI yang terkontaminasi, bahkan tanpa adanya infeksi pada ibu.⁸

Dalam sebuah penelitian, mencuci tangan yang tidak benar dikaitkan dengan kontaminasi ASI perah. Hal ini sesuai dengan kesimpulan Steele, yang mencatat bahwa mencuci tangan dengan teknik aseptik sangat berharga dalam menjaga pertumbuhan bakteri dalam tingkat yang non-patogen.⁸

Faktor lain yang berhubungan dengan kontaminasi ASI perah adalah kurangnya kebersihan payudara yang tepat. Untuk mendukung temuan ini, Rodríguez menyebutkan bahwa kulit payudara ibu mungkin menjadi sumber kontaminasi ASI.⁸

Kontaminasi ASI perah mungkin terkait dengan faktor penyimpanan dan transportasi. Merebus wadah secara signifikan terkait dengan lebih sedikitnya kontaminasi ASI. Ditemukan bahwa pertumbuhan bakteri secara signifikan terkait dengan pendinginan ASI setelah lebih dari 4 jam. Ukegbu *et al* menemukan bahwa jumlah bakteri lebih tinggi pada sampel ASI yang disimpan pada suhu ruangan hingga 9 jam dibandingkan dengan yang langsung didinginkan.^{7,8}

Selain itu, ditemukan bahwa pertumbuhan bakteri secara signifikan terkait dengan pencampuran ASI yang baru diperah dengan ASI yang didinginkan yang diperah sebelumnya pada hari yang sama. Sebenarnya, banyak penelitian telah menunjukkan bahwa ASI segar harus didinginkan sebelum ditambahkan ke ASI dingin di lemari es dan ASI yang disimpan harus diberikan menggunakan prinsip *first-in-first-out* (FIFO) dengan ASI yang paling lama waktu penyimpanannya diberikan terlebih dahulu.^{7,8}

Selain itu, kami mencatat bahwa waktu transportasi rata-rata dari ASI perah yang terkontaminasi secara signifikan lebih lama daripada ASI steril. Seperti yang

dilaporkan penelitian lain, dengan waktu dan suhu yang bervariasi, komponen dalam ASI menurun potensinya, sementara pertumbuhan patogen potensinya meningkat.⁸

Temuan penelitian ini mungkin memiliki implikasi yang signifikan. Penelitian ini menemukan prevalensi tinggi kontaminasi ASI perah. Masalah ini harus diatasi dengan mengadopsi langkah-langkah yang lebih ketat untuk mengendalikan penularan infeksi. Selain itu, penelitian ini menimbulkan kekhawatiran tentang kemungkinan bahaya yang terkait dengan penggunaan ASI perah. Mungkin, terdapat kebutuhan untuk rekomendasi yang jelas dan *evidence-based* untuk memandu keputusan pemberi perawatan tentang penggunaan ASI perah terutama pada bayi yang rentan seperti yang dirawat di NICU.^{7,8}

2.3 Metode Sterilisasi

Berdasarkan *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) Amerika Serikat membersihkan pompa ASI dapat dilakukan dengan mencuci pompa dengan air dan sabun. Bila perlu sebagai perlindungan ekstra dapat dilakukan proses sterilisasi dengan merendam air panas atau penguapan dengan mengukus dengan kantong *microwave*. Hal serupa juga disebutkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat, metode dasar mencuci pompa ASI dengan air dan sabun, menghindari mengeringkan dengan kain ataupun tisu namun dibiarkan kering di udara terbuka.⁹

Dekontaminasi uap setelah mencuci pompa ASI (dibandingkan dengan mencuci, membilas, dan mengeringkan saja) menurunkan proporsi ASI donor yang harus dibuang karena kontaminasi bakteri (menurut kriteria NICE) sebesar 17,2%. Sebagian besar pedoman bank ASI menekankan pentingnya pembersihan pompa ASI yang tepat, tetapi tidak menentukan metode pembersihan yang digunakan, sebaliknya, mereka merekomendasikan penggunaan deterjen bilas atau natrium hipoklorit tambahan.¹⁰

Cahaya ultraviolet (UV) bersifat germisidal, merupakan anti-infeksi yang menggunakan panjang gelombang cahaya, dapat membunuh mikroorganisme dan menonaktifkan virus. Sebelumnya, sinar ini digunakan untuk mengendalikan

wabah tuberkulosis dan virus influenza H1N1. Namun, pedoman yang dikeluarkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2014 mengenai pencegahan dan pengendalian infeksi saluran pernapasan akut (ISPA) yang rentan terhadap epidemi dan pandemi di bidang kesehatan, seperti sindrom pernapasan akut berat (SARS), belum melaporkan rekomendasi untuk sistem ini karena kurangnya bukti yang mendukung kemampuan penyinaran UV untuk mengurangi risiko penularan dan infeksi patogen tertentu yang menyebabkan ISPA dari pasien ke petugas kesehatan selama pemberian perawatan, dengan atau tanpa menggunakan tindakan pencegahan lainnya.¹¹

UV-C, yang menggunakan panjang gelombang pendek 250–280 nm, dianggap sebagai panjang gelombang yang paling mematikan karena kemampuannya menonaktifkan mikroorganisme karena diserap kuat dalam asam nukleatnya. Hal ini sering menyebabkan pembentukan dimer pirimidin siklobutana (CPD) dalam untai asam nukleat, yang dapat menyebabkan cacat dalam replikasi sel dan akhirnya kematian sel.¹¹

UV-C dapat digunakan sebagai pelengkap protokol pembersihan manual terminal di rumah sakit karena khasiatnya sebagai agen pembasmi kuman. UV-C dapat sangat berguna di tempat-tempat dengan lalu lintas tinggi, sentuhan tinggi, dan permukaan dengan beban biologis tinggi. Selain khasiatnya, UV-C juga membutuhkan lebih sedikit waktu dan tenaga kerja. Namun, penelitian lebih lanjut harus dilakukan untuk menetapkan standar dosis paparan yang aman, terutama untuk lampu pembasmi kuman 222 nm. Secara keseluruhan, penggunaan UV-C sebagai alat desinfektan dapat mengatasi masalah keamanannya dengan standarisasi dosis dan kemungkinan penggunaan iradiasi UV-C 222 nm.¹¹

Pada sebuah penelitian metaanalisis membandingkan efektivitas metode disinfeksi air minum di Indonesia antara UV dibandingkan dengan metode lainnya didapatkan bahwa metode UV secara signifikan dapat menurunkan kadar bakteri *E. coli* yang didapatkan dalam air minum.¹²