Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 1, 2002, 30 – 35
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Identifikasi Cemaran *Listeria* spp dari Daging Sapi

Marlina[1*], Zadiar[1], Endang Purwati[2] dan Wendi[1]
[1]*Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang*
[2]*Fakultas Peternakan, Universitas Andalas, Padang*

Diterima 15 Januari 2002 ; Disetujui 1 Maret 2002

Abstract

Study on detection and identification of *Listeria* spp. from ground beef in Padang city has been carried out. Sample was kept for 24 hours, 48 hours and 96 hours in freezer at temperature –10°C then detected based on modification USDA method and compared with the raw ground beef without kept at room temperature. The enrichment used Fraser Broth and homogenat process was mixed in blender. One Ose homogenat scratched onto Palcam Agar. The bluish-green single colony which has black haloes was taken and identified. The result indicate that *Listeria* spp. was found in all samples of n. 2 and n. 3 which were kept for 24 hours, 48 hours, 96 hours, and on raw ground beef without kept.

Keywords : *Listeria* spp., identification and beef

Pendahuluan

Daging sapi mengandung zat-zat makanan yang dibutuhkan oleh manusia karena mengandung sumber asam amino esensial, sedikit mineral tertentu, vitamin-vitamin dan asam-asam lemak esensial (Lawrie, 1995). Selainm mengandung nilai gizi yang tinggi, daging sapi merupakan salah satu media yang baik bagi pertumbuhan mikroorganisme karena mengandung banyak air dan mempunyai pH yang sangat menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan mikroorganisme pada substrat ini akan membusukan protein, memfermentasi karbohidrat dan mengoksidasi lemak, sehingga menyebabkan mutu makanan tersebut menurun (Supardi dan Sukamto, 1999; Forrest, 1975; Hamid, 1975).

Selain dari bakteri pembusuk, bakteri lain yang berbahaya dan tumbuh pada daging sapi adalah keberadaan bakteri patogen. Bakteri patogen yang sering dipindahkan oleh hewan yang sudah terinfeksi kepada manusia meliputi *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* yang menyebabkan penyakit-penyakit listeriosis, anthraks, tuberkulosis, dan lain-lain (Breck and Katherin, 1978).

Sedangkan bakteri patogen yang paling sering dipindahkan melalui makanan menurut Prescott meliputi *Salmonella typhimurium* dan *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* yang menyebabkan penyakit-penyakit salmonellosis, listeriosis, campylobacteriosis, diare serta kolik *Escherichia coli*, dan yersiniosis (Precott, *et. al.*, 1993).*L. monocytogenes* merupakan bakteri yang sering mengakibatkan "outbreak" pada daerah Eropa, Amerika Serikat, Canada dan Amerika Latin (Ryser and Marth, 1991; Jay, 1997).

Salah satu bakteri yang sering mencemari bahan makanan adalah *Listeria* spp. *Listeria* spp. tergolong bakteri gram positif, tidak membentuk spora dan berbentuk batang dengan ujung yang bulat. Pada sel muda yang diisolasi akan tampak sebagai diplokokus atau kokus. Sedangkan pada sel yang tua dan strain (keturunan) kasar akan berbentuk batang yang panjang setelah diinkubasi selama 3 – 5 hari. Karakter morfulogi yang khas dari *Listeria* spp. adalah karakter motil (bergerak) dengan flagel yang paling baik diamati pada suhu 22 – 25°C di dalam medium Tryptose Broth (TB).

Listeria spp. mempunyai enam flagel tie peritrik pada suhu ini dan flagel akan berkurang sampai tertinggal hanya satu flagel apabila pengamatan

*Penulis untuk korespondensi : Tel. 62-751-71682, Faks: 62-751-73118
E-mail : farmasi_unand@telkom.net

dilakukan pada suhu 37°C, sehingga karakter motil tidak akan terlihat (Ryser and Marth, 1991; Robert, *et. al.*, 1996; Pelczar, *et. al.*, 1986).

Koloni *Listeria* spp. mempunyai diameter 0,3 – 1,5 mm setelah diinkubasi selama 24 jam dan setelah diinkubasi selama 5 – 10 hari diameter koloni menjadi 3 – 5 mm (Ryser and Marth, 1991).

Jika *L. monocytogenes* diinokulasi dalam medium Tryptose Broth (TB) pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam menyebabkan kekeruhan medium. Kekeruhan akan terlihat kurang pada permukaan medium, karena *L. monocytogenes* lebih menyukai kondisi yang oksigennya kurang, tetapi akan mati pada kondisi yang anaerob sempurna (Ryser and Marth, 1991).

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer 500 ml, ependorf, gelas kimia, lampu spiritus, jarum Ose, jarum penusuk, gelas ukur 100 ml, botol semprot, spatula, pipet tetes, pipet mikroliter, termometer, autoklaf, timbangan listrik, inkubator, refrigerator dan freezer, lemari aseptis, mikroskop, plat pemanas, blender, kaca objek, pisau dan gunting.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni *Listeria monocytogenes* BCC-29, Fraser Broth, Paleam Agar, Agar Semi Padat Motilitas, Agar Semi Padat SIM (Sulfida Indol Motilitas), Fermentasi Broth, Tryptose Soy Broth (TSB), Blood Agar Base, safranin 0,2%, kristal violet, larutan iodium, larutan H_2O_2 3%, larutan Erlich's, alkohol 70%, alkohol 95%, air suling, aluminium foil, kain kasa, kapas, benang, spiritus, spidol, kertas label. Penelitian ini juga menggunakan hewan percobaan marmut (guinea pig) untuk uji patogenitas.

Pengambilan Sampel

Sebanyak 3 sampel daging sapi diambil dari beberapa tempat di Kota Padang masing-masing 150 g. Sampel-sampel ini diambil dari tiga pasar yaitu :

a. No. sampel 1 diambil dari pasar Bandar Buat.
b. No. sampel 2 diambil dari pasar Raya Padang.
c. No. sampel 3 diambil dari pasar Lubuk Buaya.

Perlakuan Sampel

Kemudian, setiap No. sampel diperlakukan dengan empat macam perlakuan, yaitu :

a. Perlakuan A dilakukan pengujian pada suhu kamar, tanpa penyimpanan.
b. Perlakuan B disimpan dalam freezer suhu –10°C selama 24 jam.
c. Perlakuan C disimpan dalam freezer suhu –10°C selama 48 jam.
d. Perlakuan D disimpan dalam freezer suhu –10°C selama 96 jam.

Deteksi dan Isolasi Vakteri Listeria spp. dari Daging Sapi

Metoda isolasi yang digunakan adalah modifikasi metoda USDA yang telah dikembangkan Purwati (1999), yaitu dengan menimbang daging sapi mentah sejumlah 10 g dan dicuci dengan air suling steril. Sampel kemudian dibungkus dengan kantong plastik dan diperlakukan dengan menyimpannya dalam freezer suhu –10°C selama 24, 48 dan 96 jam, sedangkan sampel yang tanpa penyimpanan pada suhu kamar juga dibungkus. Daging yang telah disimpan atau yang tanpa disimpan masing-masing ditambahkan 90 ml medium Fraser Broth dan diblender selama 2 menit, sehingga terbentuk homogenat. Homogenat dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Apabila terjadi perubahan warna medium Fraser Broth dari kuning menjadi hitam, hal ini menunjukan kehadiran *Listeria* spp. Homogenat kemudian dikocok lalu diambil dengan jarum Ose. Selanjutnya digoreskan pada medium Paleam Agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 – 48 jam. Koloni dari *Listeria* spp. adalah yang berwarna kehijauan dengan dikelilingi zona hitam dan hanya koloni yang terpisah yang diambil dengan jarum Ose untuk diidentifikasi (Ryser and Marth,, 1991; Purwati, 1999; Sheridan, *et. al.*, 1994; Rorvik, *et al.*, 1991).

Identifikasi Listeria spp. Hasil Isolasi

Identifikasi *Listeria* spp. meliputi uji pewarnaan Gram, motilitas, katalase, fermentasi manitol, eskulin, sulfida, indol, hemolisa darah dan patogenitas dilakukan seperti identifikasi biakan murni *Listeria monocytogenes* BCC-29.

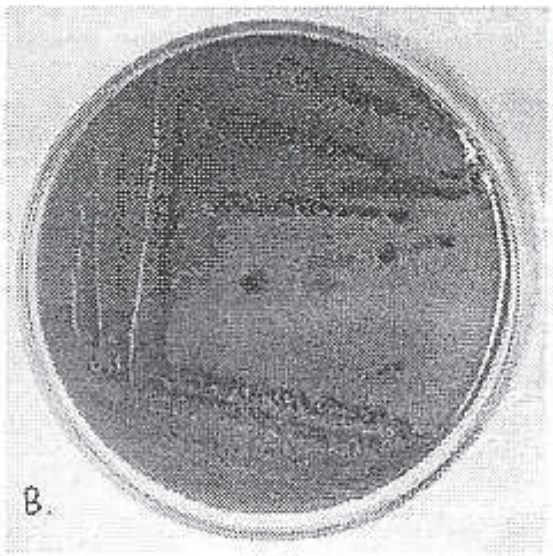
Hasil dan Pembahasan

Listeria spp. ditemukan pada sampel No. 2 dan sampel No. 3, yaitu yang diperlakukan tanpa penyimpanan pada suhu kamar dan yang disimpan pada suhu –10°C selama 24 jam, 48 jam dan 96 jam (Tabel 1 – 4). *Listeria* spp. tidak ditemukan pada sampel No. 1, yaitu yang diperlakukan tanpa penyimpanan pada suhu kamar dan yang disimpan pada suhu –10°C selama 24 jam, 48 jam dan 96 jam (Tabel 1 – 4).

Uji konfirmasi untuk sampel yang dinyatakan positif adalah dengan melakukan uji pewarnaan Gram (positif/negatif), motilitas (positif), katalase (positif), fermentasi manitol (negatif), eskulin (positif), sulfida (negatif), indol (negatif), hemolisa darah (negatif) dan patogenitas (negatif). Hasil dapat dilihat pada tabel 1 – 4.

Setelah dilakukan pembuatan homogenat daging sapi dalam medium Fraser Broth dan diinkubasi selama 24 jam, akan terjadi perubahan warna dari coklat menjadi kehitaman apabila sampel mengandung *Listeria* spp. Perubahan warna homogenat ini diakibatkan oleh dihidrolisisnya eskulin oleh *Listeria* spp. menjadi eskuletin. Selanjutnya, eskuletin ini akan membentuk kompleks berwarna hitam dengan ferri (III) amonium sitrat, sehingga kandungan eskulin dengan ferri (III) amonium sitrat di dalam medium Fraser Broth merupakan indikator pertama untuk melihat kontaminasi *Listeria* spp. di dalam sampel daging sapi, dan juga merupakan bentuk uji eskulin. Perubahan warna homogenat ini juga bisa dihasilkan oleh kontaminan yang mungkin hidup pada medium Fraser Broth yaitu *Bacillus* berspora yang aerob dan difteroid (*Crynebacterium* spp. kecuali *Corynebacterium diptheroid*).

Penanaman satu Ose homogenat di atas medium Palcam Agar menghasilkan koloni *Listeria* spp. berbentuk bulat kehijauan yang dikelilingi warna hitam, bentuk dari koloni ini dapat dilihat pada Gambar 1. Terbentuknya warna hitam ini juga menunjukan uji eskulin yang terlihat pada semua sampel, kecuali pada sampel No. 1. Hasil uji eskulin pada medium Palcam Agar ini terlihat lebih jelas apabila dibandingkan dengan hasil uji eskulin pada medium Fraser Broth. Kandungan manitol dan fenol merah di dalam media menunjukan uji fermentasi manitol. *Listeria* spp. tidak memfermentasi manitol yang menyebabkan warna fenol merah media tidak berubah. Sedangkan, kontaminan seperti *Stapylococcus* spp. akan merubah warna media menjadi kuning karena koloni ini memfermentasi manitol. Warna kuning terlihat pada sampel No. 1, tetapi kadang kala uji harus dipertegas dengan memakai medium Fermentasi Broth, seperti yang terjadi pada sampel No. 1, dimana hasil positif terlihat setelah dilakukan fermentasi memakai medium Fermentasi Broth.



Gambar 1. Koloni *Listeria* spp pada medium Palcam Agar

Tabel 1. Hasil Identifikasi *Listeria* spp. dari daging sapi mentah tanpa penyimpanan pada suhu kamar

No. Sampel	Gram	Bentuk Sel	Motilitas	Katalase	Fermentasi Manitol	Eskulin	Sulfida	Indol	Hemolisa Darah	Patogenitas	*Listeria* spp.
1	+	Kokus	+	+	+	-	+	-	-	-	-
2	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Tabel 2. Hasil Identifikasi *Listeria* spp. dari daging sapi yang disimpan dalam freezer pada suhu −10°C selama 24 jam

No. Sampel	Gram	Bentuk Sel	Motilitas	Katalase	Fermentasi Manitol	Eskulin	Sulfida	Indol	Hemolisa Darah	Patogenitas	*Listeria* spp.
1	+	Batang	-	+	-	+	+	-	-	-	-
2	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Tabel 3. Hasil Identifikasi *Listeria* spp. dari daging sapi yang disimpan dalam freezer pada suhu −10°C selama 48 jam

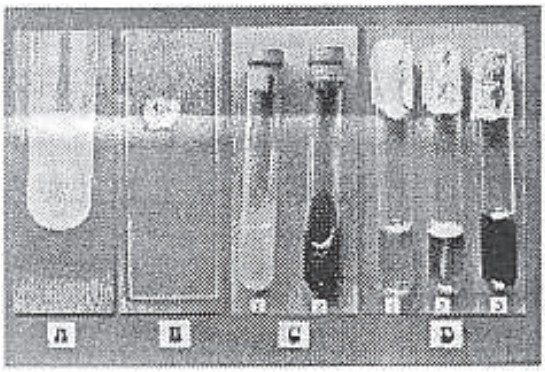
No. Sampel	Gram	Bentuk Sel	Motilitas	Katalase	Fermentasi Manitol	Eskulin	Sulfida	Indol	Hemolisa Darah	Patogenitas	*Listeria* spp.
1	-	Batang	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	-	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Tabel 4. Hasil Identifikasi *Listeria* spp. dari daging sapi yang disimpan dalam freezer pada suhu −10°C selama 96 jam

No. Sampel	Gram	Bentuk Sel	Motilitas	Katalase	Fermentasi Manitol	Eskulin	Sulfida	Indol	Hemolisa Darah	Patogenitas	*Listeria* spp.
1	-	Batang	-	+	-	+	+	-	-	-	-
2	+	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	-	Batang	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Uji uji biokimia merupakan bagian dari upaya identifikasi bakteri yang telah diisolasi, yaitu berupa ujia katalase, fermentasi manitol, eskulin, sulfida dan indol (Tabel 1 – 4).

Uji sulfida negatif pada *Listeria* spp. menunjukan bahwa bakteri tidak mendegradasi asam amino yang mengandung unsur sulfur dan tidak menghasilkan H_2S serta tidak menimbulkan kebusukan pada makanan. Uji indol yang juga negatid menunjukan bahwa *Listeria* spp. tidak mendegradasi asam amino yang mengandung gugus indol, sehingga tidak dihasilkan senyawa indol. Hasil kedua uji ini terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji biokimia *Listeria* spp

Keterangan :

A. Zona motilitas pada media motilitas semi padat untuk *Listeria* spp
B. Terbentuknya busa pada uji katalase
C. Hasil fermentasi manitol
C.1. Warna hasil fermentasi manitol (positif)
C.2. Warna hasil fermentasi manitol (negatif)
D. Hasil uji sulfida dan indol pada medium SIM
D.1. Hasil sulfida (negatif) dan indol (negatif) *L. Monocytogenes* BCC-29
D.2. Hasil sulfida (negatif) dan indol (negatif) dari sampel
D.3. Hasil sulfida (positif) dan indol (negatif) dari sampel

Uji fermentasi manitol berguna untuk mengetahui apakah *Listeria* spp. akan memfermentasi manitol untuk sumber makanannya. Medium Fermentasi Broth ini memakai indikator biru bromtimol, dimana pada pH 6,0 – 7,6 indikator berwarna biru (hasil uji negatif) dan pada pH 4,8 akan berwarna kuning (hasil uji positif), hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2. Perubahan warna terjadi karena pada fermentasi manitol, bakteri menghasilkan asam laktat yang akan menurunkan pH inokulum. *Listeria* spp. adalah genus yang tidak memfermentasi manitol kecuali *L. murrayi* dan *L. denitrificans*. Uji fermentasi manitol akan membedakan *Listeria* spp. (kecuali *L. murrayi* dan *L. denitrificans*) dengan *Stapylococcus* spp. yang merupakan salah satu genus yang sering mengkontaminasi pada medium Palcam Agar.

Uji motilitas merupakan uji yang khas untuk mengidentifikasi *Listeria* spp. yang memakai media semi padat khusus untuk *Listeria* spp. Media mengandung glukosa sebagai sumber energi untuk meningkatkan pergerakan (motilitas) *Listeria* spp. Suhu inkubasi adalah pada 20 – 22°C, dimana suhu ini akan membedakan antara *Listeria* spp. (positif motil) dengan *Corynebacterium* spp. (negatif motil). Hal ini disebabkan karena pada suhu ini *Listeria* spp. memiliki enam flagel peritrik, tetapi pada suhu 30°C flagel akan berkurang sampai menjadi satu flagel (Ryser and Marth, 1991). Bakteri yang negatif motil pada suhu ini adalah negatif *Listeria* spp., seperti yang terlihat pada sampel No. 1.

Uji hemolisa darah dilakukan untuk melihat dihasilkan β-hemolisis. Spesies yang menghemolisa darah adalah *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua* dan *L. seeligeri*, sedangkan spesies lain yaitu *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi* dan *L. denitrificans* tidak menghemolisa darah. Semua sampel pada setiap No. sampel yang diisolasi tidak menghemolisa darah. Spesies yang tidak menghemolisa darah ini tidak menimbulkan penyakit pada manusia.

Uji patogenitas akan membedakan *Listeria monocytogenes* dengan spesies *Listeria* spp. lainnya yang menghemolisa darah. *L. ivanovii* jarang bersifat patogen dan *L. seeligeri* serta *L. innocua* tidak pernah bersifat patogen pada hewan dan manusia. Hal ini disebabkan karena toksin listeriolisin O yang dihasilkan oleh *L. monocytogenes* yang paling bersifat patogen apabila dibandingkan dengan toksin-toksin yang dihasilkan oleh *Listeria* spp. lainnya (Ryser and Marth, 1991;

Hof and Rocourt, 1992). Hasil positif terjadi apabila pada mata marmut timbul konjungtivitas dengan gejala berupa timbulnya kekeruhan pada kornea mata marmut, terdapatnya eksudat bernanah dan disertai demam pada marmut (Cottral, 1978). Hasil negatif pada uji patogenitas sangat dipengaruhi oleh jumlah sel yang dioleskan, dimana konjungtivitis timbul pada konsentrasi 10^6 sel *L. monocytogenes*.

Pada tabel hasil identifikasi *Listeria* spp. terlihat bahwa sampel No. 1 tidak terkontaminasi oleh *Listeria* spp. Namun koloni yang ditemukan adalah kontaminan lainnya dengan jenis yang berbeda-beda. Pada sampel dengan perlakuan tanpa penyimpanan pada suhu kamar, koloni yang didapat adalah *Staphylococcus*. Akan tetapi, pada sampel yang disimpan pada suhu –10°C selama 24 jam, 48 jam dan 96 jam, koloni yang didapat adalah *Bacillus*. Perbedaan hasil identifikasi ini terjadi karena koloni *Staphylococcus* akan tumbuh pada suhu kamar dan akan mati setelah disimpan pada suhu –10°C, sedangkan koloni *Bacillus* dapat bertahan hidup pada suhu –10°C.

Kesimpulan

Setelah dilakukan penelitian deteksi dan identifikasi *Listeria* spp. pada daging sapi dari beberapa tempat di Kota Padang, maka diambil kesimpulan :

1. *Listeria* spp. ditemukan pada sampel yang diteliti, yaitu sampel No. 2 dan No. 3, baik sampel mentah tanpa penyimpanan pada suhu kamar maupun sampel yang disimpan dalam freezer suhu –10°C selama 24 jam, 48 jam dan 96 jam.
2. Penyimpanan daging sapi dalam freezer sampai 96 jam tidak mematikan *Listeria* spp.

Daftar Pustaka

Brock, D.T. and Katherin, M.B., 1978, Basic Microbiology with Application, 2nd Ed., Prentice Hall Inc., New Jersey.

Cottral, E.G., 1978, Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology, 1st Ed., Cornell University, United Kingdom.

Forrest, J.C., 1975, Principle of Meat Science, 1st Ed., W.H. Freeman and Co., San Fransisco.

Hamid, A., 1975, pH dan Pembusukan Daging, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor.

Hof, H., and J. Rocourt, 1992, Is any Strain of *Listeria monocytogenes* Detected in Food a Health Risk?, *Inter. J. Food. Micr.*, 16, 173-182.

Jay, J.M., 1997, Modern Food Microbiology, 5th Ed., Chapman and Hall, New York.

Lawrie, R.A., 1995, Ilmu Daging, Edisi V, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Pelczar, M.J., E.C.S. Chan and N.R. Kneg, 1986, Microbiology, 5th Ed., McGraw Hill Book Company, Inc., New York.

Prescott, L.M., J.P. Harley and D.A. Klein, 1993, Microbiology, 2nd Ed., WmC. Brown Publisher, Dubuque, Iowa.

Purwati E., 1999, Prevalence of *Listeria* Species Isolated from Beef in Malaysia, *J. Peternakan dan Lingkungan*, 5(03), 14-17.

Roberts, T.A., A.C. Braird-Parker and R.B. Tompkin, 1996, Microorganisms in Food : Microbiological Specifications of Food Pathogens, 1st Ed., London.

Rorvik, L.M. and M. Yndestad, 1991, *Listeria monocytogenes* in Food in Norway, *Elsevier Science Publisher B.V.*, 91, 97-104

Ryser, E.T., and E.H. Marth, 1996, *Listeria*, Listerioris and Food Safety, 1st Ed., Marcel Dekker, New York.

Sheridan, J.J., G. Duffy, R.L. Buchanan, D.A. McDowell and I.S. Blair, 1994, The Use of Selective and Non-selective Enrichment Broth for the Isolation of *Listeria* species from Meat, *Food. Micr.*, 11, 439-446.

Supardi, I., dan Sukamto, M., 1999, Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan, Edisi I, Penerbit Alumni Bandung.