

REVIEW: DETEKSI *Listeria monocytogenes* DALAM MAKANAN

Nur Liyana binti Rahim, Sri Agung Fitri Kusuma

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang, Hegarmanah, Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat 45363,
Indonesia
nur14025@mail.unpad.ac.id

ABSTRAK

Listeria monocytogenes adalah jenis patogen bawaan makanan yang akan menyebabkan listeriosis di mana memiliki kecenderungan sampai 30% tingkat kematian untuk populasi berisiko tinggi. Hasil dari review mendapati adanya metode seperti berikut: (1) Metode isolasi dan enumerasi (*International Organization for Standards (ISO) 11290-1: 1996 + A1: 2004 BS 5763-18: 1997, ISO 11290-2: 1998 + A1; 2004*), Standar PrPN EN ISO 11290-Z: 1999, metode USFDA/ BAM/ CFSAN) dan (2) Metode deteksi di mana untuk konfirmasi *Listeria spp.* (pewarnaan Gram, uji katalase, uji motilitas) dan untuk *Listeria monocytogenes* (uji hemolisis, uji CAMP, utilisasi karbohidrat).

Kata Kunci: Deteksi, *Listeria monocytogenes*, Makanan

Abstract

Listeria monocytogenes is a type of foodborne pathogens that will cause listeriosis where it has a tendency of up to 30% mortality rate for high-risk populations. The results of the review found the following methods: (1) Isolation and enumeration methods (*International Organization for Standards (ISO) 11290-1: 1996 + A1: 2004 BS 5763-18: 1997, ISO 11290-2: 1998 + A1; 2004*), PrEP EN ISO 11290-Z: 1999 Standard, USFDA / BAM / CFSAN method) and (2) Detection method which is to confirm *Listeria spp.* (Gram staining, catalase test, motility test) and for *Listeria monocytogenes* (hemolysis test, CAMP test, carbohydrate utilization)

Keywords: Detection, *Listeria monocytogenes*, Food

Pendahuluan

Listeria monocytogenes dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif berbentuk batang, pembentukan non-spora, dan anaerob fakultatif yang bertanggung jawab atas penyakit infeksi tertentu pada

manusia. *Listeria monocytogenes* dan *Listeria ivanovii* adalah satu-satunya patogen di antara enam spesies (Robinson et al., 2000).

Spesies ini dapat hidup dalam suhu ekstrim, kondisi garam dan pH dalam berbagai lingkungan (Sleator, et al., 2003).

Listeriosis adalah penyakit unik yang mewakili masalah kesehatan masyarakat yang cukup besar karena tingkat kematiannya yang tinggi mencapai 20% sampai 40% (McLaunchlin, et al., 2004).

Pada mamalia atau manusia, *Listeria monocytogenes* dapat menyebabkan aborsi spontan dan merupakan penyebab penyakit yang melingkar yang merupakan manifestasi dari meningitis basilar. Transmisi *fecal-oral* adalah kemungkinan yang dilakukan oleh *Listeria spp.* Ia tersebar pada hewan dan dapat ditularkan langsung dari hewan ke manusia. Transmisi vertikal dari ibu ke neonatus terjadi trans plasenta atau melalui jalan lahir yang terinfeksi (Mead, et al., 1999).

Listeriosis akan menjadi masalah terbesar bagi kelompok berisiko tinggi seperti pada neonatus, ibu hamil, orang dengan kekebalan tubuh dan orang tua. Ini

sering memberi gejala flu dan gejala gastroenteritis non-spesifik pada tahap awal namun akan berkembang menjadi penyakit serius (misalnya meningitis dan sepsis) jika tidak disembuhkan dengan pengobatan antibiotik yang tepat (Vazquez-Boland, et al., 2001).

Listeria monocytogenes biasanya terkontaminasi pada sosis ayam (15% - 70%), selain daripada ikan, sayuran dan susu mentah, daging sapi, unggas, keju, dan ayam (Posfay-Barbe & Wald, 2009).

Berdasarkan sebuah penelitian, kontaminasi silang dapat terjadi selama tahap pasca pengolahan seperti mengiris, pengelupasan dan pengemasan (Murphy, et al., 2005).

Jadi, data *review* ini berfokus pada identifikasi *Listeria monocytogenes* dalam makanan.

Metode

Metode yang digunakan dalam penyusunan *review* ini menggunakan metode kajian pustaka dengan cara pengambilan

data dari beberapa sumber yang diperlukan sesuai dengan topik yang dibahas. Pengumpulan data primer secara keseluruhan sebanyak 16 jurnal manakala data sekunder melibatkan 2 buah buku dan media *online* yaitu Google. Kata kunci yang digunakan ialah deteksi, *Listeria monocytogenes* dan makanan.

Pembahasan

Pengumpulan Sampel

Hasil daripada *review*, diketahui masing-masing peneliti menggunakan sampel berikut untuk mengidentifikasi *L. monocytogenes*: Minuman, telur, makanan laut, selada, dan masing-masing produk digunakan sebagai sampel (Jamali, et al, 2013; Shrinithiviahshini, et al., 2011). Yang lainnya menggunakan daging ayam dingin beku (-18°C) (Alsheikh, et al., 2014); Ahmed, et al., 2017), selada segar (Rapeanu, et al., 2008), sayuran (timun, kol, wortel, tomat) (Ajayeoba, et al., 2016), susu mentah dan produknya (Khan, et al., 2013), produk sosis (Pusztahelyi, et al., 2016) dan

pengolahan daging (Dabrowski, et al., 2003). Sampel dikumpulkan dalam wadah es steril pada suhu 4 °C dalam waktu 24 jam ± 1 jam sebelum dianalisis.

Metode Isolasi dan Enumerasi

ISO 11290-1: 1996 + A1: 2004 BS 5763-18: 1997

1. Pengayaan Primer

Untuk ayam, minuman, telur, makanan laut, dan produk masing-masing: Ditambahkan 25 g/ 25 ml sampel ke dalam kantong *stomacher* steril (225 ml *Half Fraser Broth*) secara aseptik. Dengan menggunakan *Lab Blender 400*, dihomogenisasi pada 260 rpm selama 1 menit dan diinkubasi pada suhu 30°C ± 1°C selama 24 jam (Jamali, et al., 2013; Alsheikh, et al., 2014; Pusztahelyi, et al., 2016; Ahmed, et al., 2017).

Untuk selada dan sayuran: Sampel dicampur dengan *blender* yang steril (25 g, 5 menit; 10 g, 2 menit) dan diperkaya dengan pengenceran 10 g *aliquot* dalam 90 ml *one-*

broth Listeria / Semi Fraser Broth. Divorteks selama 1 menit dengan inversi tangan dan diinkubasi pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (Ajayeoba, et al., 2016; Rapeanu, et al., 2008).

2. Pengayaan Sekunder

Untuk ayam, minuman, telur, makanan laut, dan produk masing-masing: 0,1 ml *Half Fraser Broth* ditambahkan ke 10 ml *Fraser Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Alsheikh, et al., 2014; Jamali, et al., 2013; Pusztahelyi, et al., 2016; Ahmed, et al., 2017).

Untuk selada segar: 0,1 ml *aliquot* dari pengayaan pertama dialihkan ke 10 ml *Fraser Broth* dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam (Rapeanu, et al., 2008).

3. Isolasi Selektif

Untuk ayam, minuman, telur, makanan laut, dan produk masing-masing, selada segar: 1 ose pengayaan sekunder digores pada permukaan: (1) *Chromogenic Listeria* (koloni hijau biru yang dikelilingi

oleh zona lingkaran tidak tembus cahaya); (2) Agar Selektif *Listeria / Agar Oxford* (koloni kehijauan dikelilingi oleh lingkaran hitam dan pusat cekung dengan kemilau hijau kehijauan); (3) Agar *PALCAM* (morfologi homogen), pada suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 35^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Jika tiada koloni yang muncul, inkubasi tambahan dilakukan sampai 24 jam berikutnya (Jamali, et al., 2013; Alsheikh, et al., 2014; Pusztahelyi, et al., 2016; Rapeanu, et al., 2008; Ahmed, et al., 2017).

Untuk sayuran: Inokulasi 10 μl pengayaan pertama ke dalam Agar *Brilliance Listeria* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *L. monocytogenes* memberi koloni dengan warna biru atau kehijauan (Ajayeoba, et al., 2016).

4. Plat Kemurnian

Untuk ayam, minuman, telur, makanan laut, dan produk masing-masing: 5 koloni yang diduga dari agar selektif digoreskan ke Agar *Tryptone Soya* dengan 0,6% serbuk ekstrak ragi (*TSAYE*) dan

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Jamali, et al., 2013; Alsheikh, et al., 2014).

ISO 11290-2: 1998 + A1; 2004

Untuk ayam, minuman, telur, makanan laut, dan produk masing-masing:

1. Pengayaan Primer

25 g sampel ditimbang dan ditambahkan ke dalam Erlenmeyer steril yang diisi dengan 225 ml *Buffered Peptone Water* (pH 7,2 ± 0,2) dan memungkinkan suspensi didiamkan selama 1 jam ± 5 menit pada suhu 20°C ± 2°C (Shrinithiviahshini, et al., 2011).

2. Isolasi Selektif

1 ml dari pengayaan primer ditambahkan ke Agar *PALCAM* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Shrinithiviahshini, et al., 2011).

3. Plat Kemurnian

Koloni khas dari agar selektif digores pada Agar *Tryptone Soya* dengan Ekstrak Ragi (*TSAY*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam (Scotter, et al., 2001).

Standar PrPN EN ISO 11290-Z: 1999

Untuk pengolahan daging:

. Pengayaan Primer

Dengan menggunakan swab pakai buang, sampel diswab (luas: 25 cm²). Dimasukkan ke dalam 10 ml *Half Fraser Broth* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam (Dabrowski, et al., 2003).

2. Isolasi Selektif

0,1 ml *broth* dari pengayaan primer dialihkan ke Agar Selektif *Listeria (LSA)* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Diidentifikasi koloni pertumbuhan berdasarkan ciri fenotipik (Dabrowski, et al., 2003).

Metode USFDA/ BAM/ CFSAN

Untuk daging mentah, keju, dadih dan susu:

1. Pengayaan Primer

Ditambahkan 25 g / 25 ml sampel homogen dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 jam (Khan, et al., 2013).

2. Pengayaan Selektif

Ditambahkan zat selektif yaitu 0,5% (b/v) akriflavin dan asam nalidiksat, dan

sikloheksida 1,0% (b/v). Diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (Khan, et al., 2013).

3. Isolasi Selektif

Diinokulasi 1 ose dari pengayaan selektif dan digoreskan pada Agar *Listeria Oxford* dan diinkubasi pada 37°C selama 20 jam. Ini memberi koloni hijau-hijau dengan lingkaran hitam (Khan, et al., 2013).

Metode Deteksi

Seperti yang di *review*, semua peneliti menggunakan metode yang sama untuk mendeteksi *Listeria spp.* dan *Listeria monocytogenes* di mana masing-masing digunakan sebagai metode referensi atau standar.

Konfirmasi *Listeria spp.*

1. Pewarnaan Gram

Tujuan: Untuk diferensiasi spesies bakteri Gram positif atau Gram negatif berdasarkan sifat kimia dari dinding sel (Rapeanu, et al., 2008).

Prosedur: Dengan menggunakan 16 jam - 24 jam pertumbuhan dari agar *TSAYE* (Hitchins & Chen, 2017).

Hasil: Batang Gram positif berbentuk *spheroid* dan cenderung *palisade* dengan noda tebal (Hitchins & Chen, 2017).

2. Uji Katalase

Prosedur: Dengan menggunakan hidrogen peroksida 3% dapat dideteksi adanya enzim katalase (Hitchins & Chen, 2017).

Hasil: Diamati adanya deliberasi gelembung gas untuk *Listeria spp.* (Rapeanu, et al., 2008).

3. Uji Motilitas

Prosedur: Koloni dengan pertumbuhan yang cukup dari agar *TSAYE* diambil dan diperiksa dengan cara *wet mount*, menggunakan air garam 0,85% untuk mensuspensi medium dan ditetes dengan minyak bagi melihat fase kontras di bawah mikroskop (Tipis, berbatang pendek dengan adanya motilitas sedikit berputar atau berjatuhan). Dengan menggunakan 0,35%

Medium Uji Motalitas (MTM), koloni ditusuk ke dalamnya. Sebanyak 1% 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida (TTC) ditambahkan ke medium untuk memudahkan hasil bacaan dan interpretasi. Diinkubasi pada suhu kamar sampai 7 hari (Dabrowski, et al., 2003; Hitchins & Chen, 2017).

Hasil: *Listeria* spp. akan menunjukkan ukuran berbentuk payung merah (Dabrowski, et al., 2003).

Konfirmasi *Listeria monocytogenes*

1. Uji Hemolisis

Prosedur: Koloni dari agar TSAYE diinokulasi dengan 5% agar darah domba oleh plat tusuk (periksa kelembaban sebelum digunakan). Gambarkan grid (20-25) di dasar piring dan tusuk satu kultur per ruang grid. Gunakan *L. monocytogenes* sebagai kontrol positif dan *L. innocua* sebagai kontrol negatif. Diinkubasi pada 37°C ± 35°C selama 24 sampai 48 jam (Hitchins & Chen, 2017).

Hasil: *Listeria monocytogenes* menunjukkan zona sempit, jernih dan terang (β -hemolisis) (Alsheikh, et al., 2014).

2. Uji Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP)

Prosedur: Isolat segar dari β -hemolitik *Staphylococcus aureus* dan *Rhodococcus equi* digores secara vertikal pada plat agar darah domba. Garis-garis vertikal dipisahkan sehingga tangkai uji dapat digoreskan secara horizontal di antara keduanya tanpa menyentuh garis-garis vertikal. Diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam (Rapeanu, et al., 2008).

Hasil: Plat untuk hemolisis di zona garis-garis vertikal diperiksa: Hemolisis *L. monocytogenes* ditingkatkan mendekati *S. aureus* yang digoreskan (Hitchins & Chen, 2017).

3. Uji Fermentasi Gula / Utilisasi Karbohidrat

Prosedur: Koloni dari agar TSAYE dikultur dalam ekstrak kedelai yang

diperkaya dengan ekstrak ragi (*TSYEB*) dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam. Saat kekeruhan muncul, diinokulasikan satu lingkaran kultur ke dalam suplemen *broth* dengan larutan karbohidrat tertentu (L-rhamnose atau D-xylose). Diinkubasi pada suhu 35°C - 37°C selama 5 hari. Perubahan warna medium yang signifikan dari ungu menjadi kuning karena pengasaman medium.

Hasil: *L. monocytogenes* menunjukkan D-xylose (negatif) dan L-rhamnose (positif) (Dabrowski, et al., 2003).

Simpulan

Sebagai patogen intraselular oportunistik yang mampu bertahan dalam berbagai makanan, *Listeria monocytogenes* telah dikenal sebagai penyebab utama infeksi bawaan makanan selama beberapa dekad terakhir.

Penelitian ini hanya memilih metode konvensional karena memerlukan biaya lebih rendah dibandingkan metode *rapid* atau modern. Masih ada 'gold standard'

terhadap metode lain karena hasil dalam pemurnian organisme berguna untuk tujuan pengaturan dan regulasi. Di sisi lain, metode ini masih memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan waktu yang relatif lama untuk menyelesaikannya, lebih banyak media, bahan kimia dan reagen yang diperlukan, kemungkinan mencemari mikroorganisme yang menutupi keberadaan yang menjadi target dan sebagainya.

Diharapkan, *review* ini akan membantu orang lain untuk menyelesaikan studi mereka tentang deteksi *Listeria monocytogenes* pada sumber makanan.

Ucapan Terima Kasih

Studi ini dimungkinkan untuk Sri Agung Fitri Kusuma, M.Si., Apt. sebagai dosen pembimbing dan Rizky Abdullah, Ph.D., Apt. selaku dosen mata kuliah Metodologi Penelitian.

Daftar Pustaka

Ahmed, Tayeb, Ameen, Merza & Sharif, 2017. Isolation and Molecular Detection of *Listeria monocytogene* in Minced Meat, Frozen Chicken and Cheese in Duhok Province, Kurdistan

- Region of Iraq. *J. Food Microbiol Saf Hyg*, 2(1).
- Ajayeoba, Atanda, Obadina, Bankole & Adelowo, 2016. The Incidence and Distribution of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Vegetables in South-Western Nigeria. *Food Sci Nutr.*, 4(1), pp. 59-66.
- Alsheikh, Mohammed, Abdalla & Bakheit, 2014. First Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* Isolated from Frozen and Shock Frozen Dressed Broiler Chicken in Sudan. *British Microbiology Research Journal*, 4(1), pp. 28-38.
- Dabrowski, Szymanska, Koronkiewicz & Medrala, 2003. Evaluation of Efficacy of Test Recommended by a PrPN EN ISO 112290-1:1999 Standard for Identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* Isolated from Meat and Meat-Processing Environment. *Pol.J.Food Nutr. Sci.*, 12/53(3), pp. 51-55.
- Hitchins & Chen, 2017. *Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10: Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods.* [Online] Available at: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm> [Accessed 30 May 2017].
- Jamali, Chai & Thong, 2013. Detection and Isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods with Various Selective Culture Media. *Food Control*, Issue 32, pp. 19-24.
- Khan, Rathore, Khan & Ahmad, 2013. In Vitro Detection of Pathogenic *Listeria monocytogenes* from Food Sources by Conventional, Molecular and Cell Culture Method. *Braz J Microbiol*, 44(3), pp. 751-758.
- McLaunchlin, Mitchell, Smerdon & Jewell, 2004. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: A Review of Hazard Characterisation for Use in Microbiol Risk Assesment of Foods. *Int. J. Food Microbiol.*, Volume 92, pp. 15-33.
- Mead, Slutsker, Dietz, McCaig, Bresee, Shapiro, Griffin & Tauxe, 1999. Food Related Illness and Daeth in United States. *Emerging Infectioous Disease*, Volume 5, pp. 607-625.
- Murphy, Hanson, Duncan, Feze & Lyon, 2005. Considearations for Post-Lethality Treatments to Reduce *Listeria monocytogenes* from Fully Cooked Bologna Using Ambient and Pressurized Steam. *Int. J. Food Microbiol.*, Issue 90, pp. 1000-1005.
- Posfay-Barbe & Wald, 2009. Listeriosis. *Semin Fetal Neonatal Med*, 14(4), pp. 228-233.
- Pusztahelyi, Szabo, Dombradi, Kovacs & Pocsi, 2016. Foodborne *Listeria monocytogenes*: A Real Challenge in Quality Control. *Scientifica (Cairo)*.
- Rapeanu, Parfene, Horincar, Polcovnicu, Ionescu & Bahrim, 2008. Confirmation and Identification of *Listeria* species from Fresh Lettuce. *Roumanian Biotechnological Letters*, 13(6), pp. 32-36.
- Robinson, Batt & Patel, 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego: Academic Press.
- Scotter, et al., 2001. Validation of ISO Method 11290 Part 1: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Int J Food Microbiol*, 64(3), pp. 295-306.
- Shrinithiviahshini, Sheelamary, Mahamuni & Chitradevi, 2011. Occurence of *Listeria monocytogenes* in Food and Ready to Eat Food Products Available in Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India. *World J Life Sci. and Medical Research*, 1(4), p. 70.
- Sleator, Gahan & Hill, 2003. A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria*

monocytogenes. *Appl Environ Microbiol*, Issue 69, pp. 1-9.

Vazquez-Boland, Kuhn, Berche, Chakraborty, Dominguez-Bernal, Goebel, Gonzalez-Zorn, Wehland & Kreft, 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev*, Volume 14, pp. 584-640.