

Penelitian

Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Listeria monocytogenes* dari Susu Sapi Segar di Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan

(Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk in Enrekang District South Sulawesi)

Kusumandari Indah Prahesti^{1,2*}, Ni Luh Putu Ika Mayasari³, Ratmawati Malaka¹,
Farida Nur Yulianti¹, Fachriyana Hasmi Pasaribu³

¹Laboratorium Mikrobiologi Hewan, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar

²Program Studi Mikrobiologi Medik, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

*Penulis untuk korespondensi: kusumandari.indah@gmail.com

Diterima 31 Oktober 2016, Disetujui 24 Februari 2017

ABSTRAK

Listeria monocytogenes merupakan bakteri patogen yang dapat menginfeksi manusia melalui bahan pangan sehingga menimbulkan penyakit listeriosis. Wabah listeriosis terjadi akibat konsumsi bahan pangan yang terkontaminasi *L. monocytogenes*, di antaranya daging, susu, dan produk susu. Serotipe bakteri *L. monocytogenes* dikaitkan dengan kasus wabah epidemik dan sporadik listeriosis pada manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *L. monocytogenes* dari susu sapi segar di Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan, melakukan analisis karakteristik molekuler, dan menentukan serotipe isolat bakteri *L. monocytogenes* yang diperoleh. Sebanyak 107 sampel susu diperoleh dari lima kecamatan di Kabupaten Enrekang dan dikumpulkan menjadi 31 sampel *pool*, kemudian dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri. Tahap pengayaan dilakukan dengan media *Listeria enrichment broth* (LEB) kemudian dilakukan kultur pada media *Listeria selective agar base* (LSA), dilanjutkan dengan uji biokimiawi. Isolat bakteri *L. monocytogenes* yang diperoleh dikonfirmasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan dilakukan pengurutan oligonukleotida. Identifikasi serotipe dilakukan dengan PCR multipleks. Hasil menunjukkan bahwa sebanyak 21 isolat merupakan bakteri *L. monocytogenes* dan analisis pengurutan oligonukleotida menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki kemiripan sebesar 99% dengan strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data *GenBank*. Identifikasi serotipe menunjukkan bahwa keseluruhan isolat termasuk dalam serogrup 2, yaitu serotipe 1/2c dan 3c.

Kata kunci: isolasi, *Listeria monocytogenes*, PCR, serotipe, susu segar

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen associated with human listeriosis especially in high risk group. Listeriosis outbreaks were known as a result of consumption of contaminated food, include meat, milk, and milk products. *L. monocytogenes* serotypes have been associated with sporadic and epidemic outbreaks of human listeriosis. The aims of this study were to isolate *L. monocytogenes* in fresh milk in Enrekang District, South Sulawesi, to analyze the molecular characterization of *L. monocytogenes*, and to determine the bacteria serotypes. A total of 107 fresh milk samples were collected from five sub-districts in Enrekang and pooled into 31 samples for further isolation and identification of the bacteria. Enrichment cultures in *Listeria enrichment broth* (LEB) were done prior to plating on *Listeria selective agar base* (LSA) media and followed by biochemical testing. Isolated *L. monocytogenes* were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and the PCR products were sequenced. Multiplex PCR was applied for molecular serotyping of the isolates. Result showed that 21 isolates were confirmed as *L. monocytogenes* and the DNA sequence analysis showed that all isolates in this study have 99% similarity with *L. monocytogenes* strains in *GenBank* database. Molecular serotyping showed that all isolates belong to serogroup 2, comprising serotype 1/2c and 3c.

Keywords: isolation, *Listeria monocytogenes*, PCR, raw milk, serotyping

PENDAHULUAN

Listeria monocytogenes merupakan salah satu bakteri patogen yang mendapat perhatian dalam industri pangan dan kesehatan masyarakat. Bakteri *L. monocytogenes* terdapat secara luas di tanah, tumbuhan, air permukaan, serta ditemukan pula pada silase, saluran pembuangan, limbah rumah potong, susu sapi, serta feses hewan dan manusia. Bakteri ini menginfeksi manusia melalui bahan pangan sehingga menimbulkan penyakit listeriosis. Wanita hamil, bayi dalam kandungan, dan manusia dengan gangguan sistem kekebalan merupakan kelompok beresiko tinggi terhadap penyakit ini (Garbutt, 1997).

Yulianti dan Malaka (2013) telah melakukan isolasi dan mengamati karakteristik pertumbuhan *L. monocytogenes* pada susu segar dengan penyimpanan pada suhu 4°C. Isolat diperoleh dari susu segar dari peternakan sapi perah di Makassar, Sulawesi Selatan. Penelitian tersebut menunjukkan perbedaan pembentukan filamen dan pigmen secara perlahan setelah dilakukan penyimpanan susu pada suhu 4°C yang diduga disebabkan oleh perbedaan serotipe bakteri tersebut. Doumith *et al.* (2004) membagi *L. monocytogenes* ke dalam empat grup serotipe, yaitu grup 1 terdiri dari serotipe 1/2a dan 3a; grup 2 terdiri dari serotipe 1/2c dan 3c; grup 3 terdiri dari serotipe 1/2b, 3b, dan 7; dan grup 4 terdiri dari serotipe 4b, 4d, dan 4e. Sugiri *et al.* (2013) melakukan identifikasi serotipe *L. monocytogenes* yang diisolasi dari daging ayam segar di pasar tradisional dan supermarket di Bandung, Jawa Barat. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa seluruh isolat *L. monocytogenes* yang diisolasi termasuk dalam kelompok serotipe 1/2b, 3b, dan 7.

Serotipe spesies *L. monocytogenes* ditentukan oleh keberadaan protein permukaan yang spesifik, yaitu antigen somatik (O) dengan 15 sub tipe dan antigen flagelar (H) dengan 4 sub tipe. Kombinasi spesifik antara antigen O dan antigen H menghasilkan 12 serotipe *L. monocytogenes*, yaitu 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, dan 7 (Seeliger & Jones, 1986). Kombinasi antigen O dan H menghasilkan 12 serotipe, namun diketahui bahwa hanya tiga serotipe yaitu 1/2a, 1/2b, dan 4b yang menjadi 98% penyebab terjadinya wabah listeriosis pada manusia (Wiedmann *et al.*, 1996; Jacquet *et al.*, 2002). Serotipe 1/2a adalah yang paling sering diisolasi dari makanan, namun serotipe 4b yang paling banyak menjadi penyebab wabah epidemik pada manusia. Oleh karena itu, serotipe dapat dihubungkan dengan potensi virulensi bakteri (Farber & Peterkin, 1991; Borucki & Call, 2003).

Epidemiologi *L. monocytogenes* sangat penting bagi kesehatan manusia berkaitan dengan terjadinya wabah listeriosis yang disebabkan kontaminasi bakteri ini pada berbagai bahan pangan yang dikonsumsi manusia, termasuk daging, susu, dan produk susu. Kabupaten Enrekang merupakan salah satu wilayah yang menjadi prioritas pengembangan peternakan sapi perah di Propinsi Sulawesi Selatan dengan populasi sapi perah sebanyak 1200 ekor pada tahun 2014. Populasi terbesar, yaitu sebanyak hampir 50% dari total populasi sapi perah terdapat di Kecamatan Cendana. Usaha ternak dilakukan secara tradisional dan umumnya pada skala kecil (3–5 ekor) dengan produktivitas harian 5-8 liter/ekor/hari. Pemerahan susu umumnya dilakukan secara manual oleh peternak, yang memungkinkan terjadinya kontaminasi pada susu segar yang dihasilkan, namun belum ada informasi terjadinya kontaminasi *L. monocytogenes* pada susu segar yang dihasilkan. Oleh karena itu diperlukan penelitian tentang keberadaan *L. monocytogenes* pada susu sapi segar di Kabupaten Enrekang. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri *L. monocytogenes* dari susu sapi segar di Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan, melakukan karakterisasi molekuler terhadap isolat yang diperoleh, dan menentukan serotipenya.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Susu Segar

Jumlah populasi sapi perah betina produktif di Kabupaten Enrekang adalah 1020 ekor (BPS, 2014). Sampel susu segar diambil dari 107 ekor sapi perah betina produktif. Pengambilan sampel susu segar dilakukan sebanyak 100 ml susu segar per ekor sapi secara aseptis dengan cara pemerah langsung dari ambing dan ditampung pada wadah steril. Penggabungan (*pooling*) sampel dilakukan berdasarkan kandang tempat pengambilan sampel susu yang lokasinya berdekatan, terdiri dari 3-5 sampel per *pool*.

Isolasi dan Identifikasi *Listeria monocytogenes* dari Susu Segar

Kultur pada Media Agar dan Uji Biokimiawi

Tahap pengayaan dilakukan menggunakan media *Buffered Listeria Enrichment Broth* (*Buffered* LEB, CM 0897, Oxoid, England). Sebanyak 25 ml sampel susu segar ditambahkan ke dalam 225 ml LEB kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam, 48 jam, dan 7 hari. Setelah inkubasi 24 jam, dilakukan tahap isolasi dengan menumbuhkan sebanyak satu ose

larutan tersebut pada media *Listeria Selective Agar Base* (Oxford Agar, CM 0856, Oxoid, England) dengan suplementasi *Listeria Selective Supplement* (Oxford formula, SR 0140). Inkubasi pada media *Listeria Selective Agar Base* dilakukan pada suhu 35-37 °C selama 24-48 jam. Cara yang sama dilakukan setelah inkubasi pada media LEB selama 48 jam dan 7 hari apabila tidak ada pertumbuhan bakteri pada media LSA dari biakan media LEB yang diinkubasi selama 24 jam.

Pertumbuhan *Listeria* dapat ditandai dengan keberadaan koloni pada media LSA yang berdiameter 1 mm dengan *halo* berwarna coklat-hitam. Koloni tersebut kemudian diuji lanjut dengan pewarnaan Gram dan uji biokimiawi yaitu uji fermentasi karbohidrat (rhamnosa, mannitol, dan xylosa), uji motilitas pada media sulfide-indol-motilitas (SIM), uji katalase, uji KOH 3%, dan uji hemolisa pada media agar darah. Strain *L. monocytogenes* ATCC 7644 digunakan sebagai kontrol positif.

Ekstraksi DNA Bakteri

DNA bakteri diekstraksi dengan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid Biotech Ltd.) sesuai dengan panduan perusahaan. Konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh diukur dengan spektrofotometer pada panjang

gelombang 260 nm dan 280 nm.

Identifikasi Gen Hemolisin (*hly*) dan Gen Invasive Associated Protein(*iap*)

Polymerase Chain Reaction untuk identifikasi spesies *L. monocytogenes* dilakukan menggunakan primer yang spesifik untuk gen hemolisin (*hly*) dan *invasive associated protein (iap)* (Swetha et al.,2012). Sekuens primer yang digunakan ditampilkan pada Tabel 1.

Amplifikasi dilakukan menggunakan kit QIAGEN® *HotStarTaq Plus Mastermix* sesuai dengan panduan perusahaan. Campuran reaksi amplifikasi mengandung 1 µl *template* DNA bakteri, 10 µM masing-masing primer sebanyak 1µl, 10 µl 1×QIAGEN *HotStarTaq Plus Mastermix* (mengandung 5U *taq polymerase*, PCR buffer dengan 3 mM MgCl₂, dan 400 µM dNTP), dan RNase free water dengan volume akhir 20 µl. Siklus PCR diawali dengan pre-denaturasi pada 95 °C selama 3 menit diikuti dengan 35 siklus dengan suhu 95°C selama 1 menit, 54-59°C (suhu *annealing* masing-masing primer seperti tercantum pada Tabel 1)selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, dan tahap akhir 72°C selama 10 menit. Produk PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1.5% yang mengandung etidium bromida 0.4 µg/ml dan diamati menggunakan UV transluminator.

Tabel 1 Primer yang digunakan untuk identifikasi spesies *L. monocytogenes*^a

Primer	Gen target	Sekuen primer	Ukuran produk (bp)	Suhu Annealing(°C)
<i>iap</i>	<i>iap</i>	For: 5'-ACAAGCTGCACCTGTTGCAG-3' Rev: 5'-TGACAGCGTGTAGTAGCA-3'	131	59
<i>hlyA</i>	<i>hly</i>	For: 5'-GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA-3' Rev: 5'-GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG-3'	456	54

^aSumber: Swetha et al. (2012)

Tabel 2 Primer yang digunakan untuk identifikasi serotipe *L. monocytogenes*^a

Primer	Sekuen primer	Ukuran produk (bp)	Spesifisitas serotipe
<i>lmo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
<i>lmo1118</i>	For: AGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGACTACTTA	906	1/2c, 3c
ORF2819	For: AGCAAATGCCAAAACCTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
ORF2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4d, 4e

^aSumber: Doumith et al.(2004)

Pengurutan Oligonukleotida (Sequencing) DNA

Produk-produk PCR yang menunjukkan hasil positif terhadap *L. monocytogenes* dikirim untuk proses sekuensing DNA. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit serta primer hlyA-forward. Hasil sekuensing DNA dianalisis dengan perangkat lunak BioEdit® sequence alignment editor (Hall, 1999). Parameter yang dianalisis adalah kemiripan susunan oligonukleotida dari isolat sampel dengan beberapa strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data di GenBank.

Identifikasi Serotipe Isolat *Listeria monocytogenes*

Identifikasi serotipe isolat *L. monocytogenes* dilakukan dengan metode PCR multipleks menurut Doumith *et al.* (2004). Tabel 2 menampilkan sekuens primer dan spesifisitas serotipenya yang digunakan dalam PCR multipleks. Reaksi PCR multipleks dilakukan menggunakan QIAGEN® Multiplex PCR Kit sesuai dengan panduan perusahaan. Campuran reaksi amplifikasi mengandung 1 µl template DNA bakteri, 10 µM masing-masing primer sebanyak 0.4 µl, 10 µl 1×QIAGEN Multiplex PCR mastermix, dan RNase free water dengan volume akhir 20 µl. Siklus PCR diawali dengan pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 menit, diikuti dengan 35× (94 °C selama 30 detik, 57 °C selama 90 detik dan 72 °C selama 90 detik) dan ekstensi akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR multipleks divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% yang mengandung etidium bromida 0,4 µg/ml dan diamati menggunakan UV transluminator.

Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Pengambilan Sampel Susu Segar

Sampel susu segar diambil dari 107 ekor sapi secara acak dari lokasi pemeliharaan sapi perah pada lima kecamatan yang merupakan sentra pemeliharaan sapi perah di Kabupaten Enrekang, yaitu Kecamatan Enrekang, Cendana, Baraka, Anggeraja, dan Alla. Tabel 3 menampilkan jumlah sampel susu segar yang diambil dari masing-masing kecamatan.

Isolasi dan Identifikasi *Listeria monocytogenes* dari Susu Segar

Kultur pada Media Agar dan Uji Biokimiawi

Kultur pada media *Listeria selective agar* (LSA) setelah dilakukan pengayaan pada media *Listeria enrichment broth* (LEB) menunjukkan hasil semua sampel (31 pool) dapat tumbuh pada media selektif tersebut dan sebagian besar kultur terdiri atas 2 koloni bakteri yang berbeda, yaitu koloni yang membentuk halo berwarna coklat-hitam dan koloni yang tidak membentuk halo. Kultur kontrol positif bakteri *L. monocytogenes* ATCC 7644 pada media LSA menghasilkan koloni bakteri berdiameter 1 mm dengan halo berwarna coklat-hitam (Gambar 1).

Pewarnaan Gram dari 31 koloni menunjukkan hasil sebanyak 24 koloni berbentuk batang dan bersifat Gram positif, dan selanjutnya diuji lanjut dengan uji biokimiawi. Hasil uji biokimiawi terhadap 24 isolat menunjukkan sebanyak 21 isolat adalah *L. monocytogenes*. Kedua puluh satu isolat tersebut menunjukkan hasil positif untuk fermentasi rhamnosa dan uji katalase, serta hasil negatif untuk fermentasi xylosa, fermentasi mannitol, dan uji KOH. Pada pengujian motilitas, terdapat 5 dari 21 isolat yang menunjukkan hasil negatif, sedangkan pada pengujian hemolisa dengan media agar darah terdapat 9 dari 21 isolat yang menunjukkan hasil negatif.

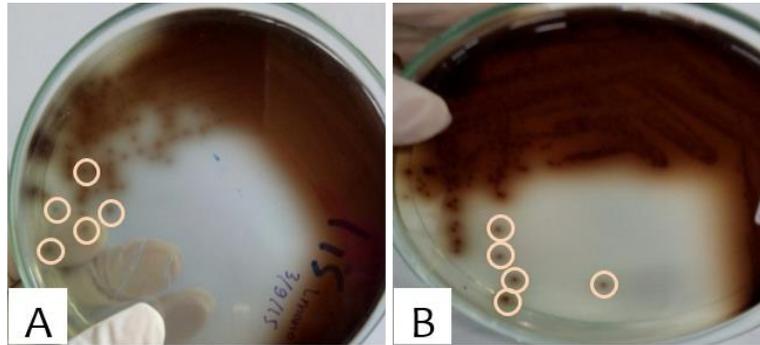
Listeria monocytogenes diketahui bersifat motil bila ditumbuhkan pada suhu 20-25°C dengan adanya pertumbuhan flagela peritrikus (Gyleset *al.*, 2010). Motilitas *L. monocytogenes* ditunjukkan oleh pertumbuhan berbentuk payung pada media semipadat. Pada pengujian motilitas, sering kali ditemukan isolat *L. monocytogenes* yang non motil, sehingga hasil pengujian motilitas saja tidak cukup untuk menentukan isolat tersebut adalah *L. monocytogenes* (Gorski, 2008). Kemampuan *L. monocytogenes* menghasilkan zona hemolisa pada media agar darah disebabkan adanya toksin hemolisin yang disebut Listeriolisin O (LLO). Listeriolisin O merupakan faktor virulensi yang utama. Sekresi hemolisin sangat penting dalam pertumbuhan intraseluler dan pengenalan organisme ini oleh sel T (Farber & Peterkin, 1991).

Kualitas DNA Hasil Ekstraksi

Isolat kontrol positif *L. monocytogenes* ATCC 7644 dan 24 isolat sampel menghasilkan konsentrasi DNA bakteri yang bervariasi. Konsentrasi tertinggi adalah isolat 4B yaitu 241,2ng/µl dan konsentrasi terendah adalah isolat 29B, yaitu 10,9 ng/µl. Tingkat kemurnian DNA terendah pada isolat 4B dan 19B dengan nilai rasio A260/A280 sebesar 1,55. Nilai tersebut mengindikasikan keberadaan kontaminasi oleh protein atau fenol.

Tabel 3 Lokasi dan jumlah sampel susu segar yang diambil dari lima kecamatan di Kabupaten Enrekang

No.	Kecamatan	Jumlah sampel	Jumlah pool
1.	Enrekang	21	5
2.	Cendana	45	14
3.	Baraka	11	3
4.	Anggeraja	24	7
5.	Alla	6	2
	Jumlah	107	31



Gambar 1 Hasil kultur bakteri pada media LSA. A.Kultur isolat kontrol positif bakteri *L. monocytogenes* ATCC 7644, B. Kultur isolat sampel diduga *L. monocytogenes*

Identifikasi Parsial Gen *iap* dan *hly* dari *Listeria monocytogenes*

Reaksi PCR dilakukan menggunakan 2 pasang primer, yaitu *iap* dan *hlyA*. Hasil elektroforesis gel agarosa dari produk PCR menggunakan primer *iap* secara umum menunjukkan pita yang lebih tipis daripada hasil PCR dengan primer *hlyA*. Gambar 2 menunjukkan hasil elektroforesis gel agarosa dari produk PCR isolat *L. monocytogenes* ATCC 7644 dan isolat sampel.

Keseluruhan hasil PCR dengan primer *iap* dan *hlyA* menunjukkan hasil yang sama, yaitu 21 isolat diidentifikasi sebagai *L. monocytogenes*. Hasil tersebut sesuai dengan hasil identifikasi melalui metode kultur konvensional. Primer *iap* didesain dari gen *iap* yang mengode *invasive associated protein* (p60). Primer *hlyA* didesain dari gen *hly* yang mengode Listeriolisin O (LLO). Selama proses infeksi, LLO membantu bakteri *L. monocytogenes* untuk meloloskan diri dari fagosom. Strain *L. monocytogenes* yang kehilangan fungsi LLO menjadi bersifat nonvirulen. Sifat sitotoksik dari LLO ditandai dengan terjadinya lisis sel darah merah pada media agar darah (yaitu β -hemolisis) dan menjadi indikasi keberadaan aktivitas gen virulensi (Gorski, 2008).

Pengurutan Oligonukleotida Parsial Gen *hly* dari *Listeria monocytogenes*

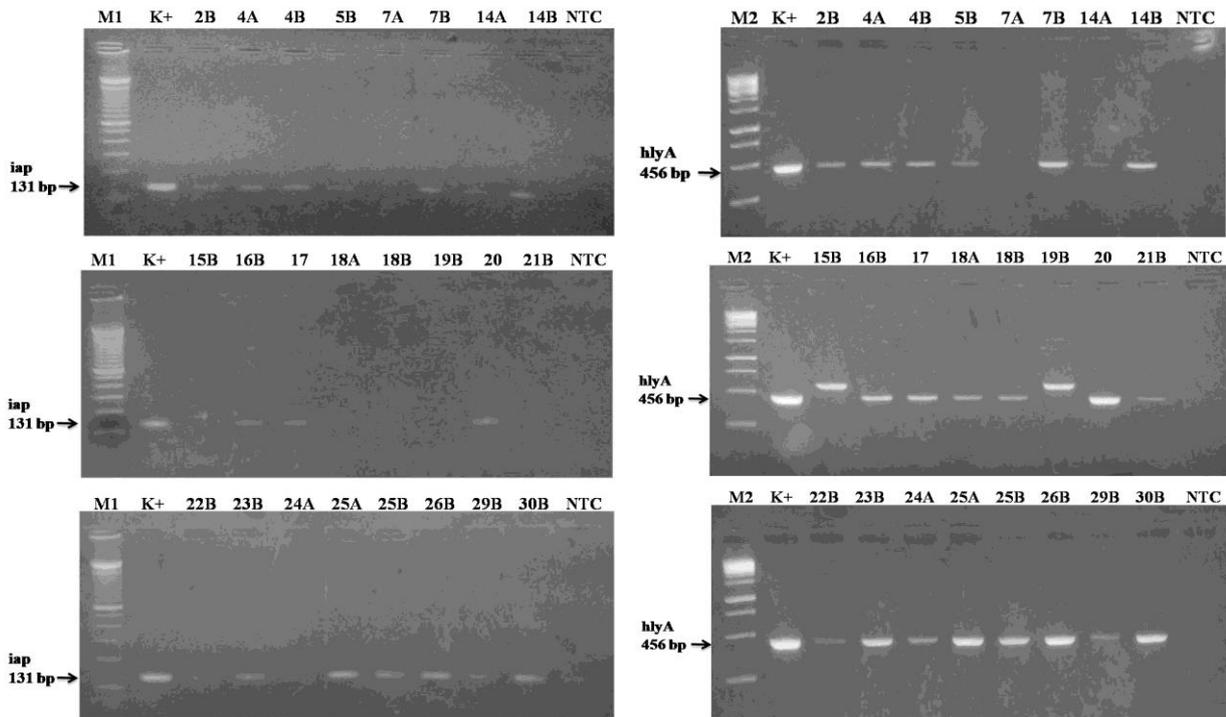
Pengurutan oligonukleotida dilakukan terhadap produk PCR dari isolat kontrol positif *L. monocytogenes*

ATCC 7644, isolat sampel 18A, 18B, 20, 25A, dan 25B. Hasil analisis kemiripan urutan oligonukleotida gen *hly* dari isolat sampel *L. monocytogenes* yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan persentase nilai kemiripan sebesar 99% dengan beberapa strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data di *GenBank* (Tabel 4).

Hasil pengurutan oligonukleotida parsial gen *hly* memperlihatkan deretan basa nukleotida sepanjang 395 basa, yaitu mulai basa ke-868 sampai dengan basa ke-1262 dari gen *hly*. Urutan oligonukleotida parsial gen *hly* dari isolat yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan urutan oligonukleotida yang sama dengan beberapa strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data *GenBank*, antara lain strain L2676, EGD, 2015 TE19005-1355, dan 2015 TE24968.

Identifikasi Serotipe Isolat *Listeria monocytogenes*

Gen penanda yang digunakan untuk pengujian PCR multipleks adalah *Imo0737* dan *Imo1118* yang diidentifikasi pada sekuen *L. monocytogenes* strain EGDe, serta ORF2819 dan ORF2110 yang diidentifikasi pada sekuen parsial dari *L. monocytogenes* strain CLIP 80459 serovar 4b (Doumith et al., 2004). Gambar 3 menunjukkan hasil elektroforesis gel agarosa dari produk PCR isolat sampel dan kontrol positif *L. monocytogenes* ATCC 7644. Hasil menunjukkan seluruh 21 isolat *L. monocytogenes* memberikan hasil positif dengan primer *Imo0737* dan primer *Imo1118*, sehingga termasuk dalam serogrup 2, yaitu serotipe 1/2c dan 3c.



Gambar 2 Hasil elektroforesis produk PCR menggunakan primer iap dan hlyA. M1: DNA marker 100 bp; M2: DNA marker 1000bp; K+: *L. monocytogenes* ATCC 7644; NTC: no template control

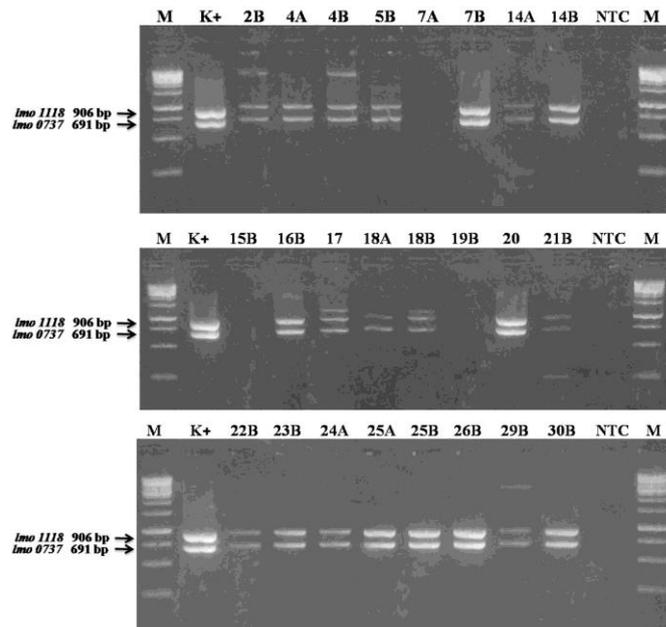
Tabel 4 Analisis kemiripan urutan oligonukleotida gen hly isolat sampel *L. monocytogenes* dengan basis data GenBank

No.	Strain <i>L. monocytogenes</i>	Kode akses Genbank	Persentase kemiripan dengan isolat sampel
1.	2015 TE24968, complete genome	CP014790.1	99%
2.	EGDe, complete genome	HG421741.1	99%
3.	L2676, complete genome	CP007685.1	99%
4.	L2626, complete genome	CP007684.1	99%
5.	J2-031, complete genome	CP006593.1	99%
6.	2015 TE19005-1355, complete genome	CP014261.1	99%
7.	WSLC 1001, complete genome	CP007160.1	99%
8.	Lm 3163, complete genome	CP013722.1	99%
9.	L1846, complete genome	CP007688.1	99%
10.	FSL R2-561, complete genome	CP002003.1	99%

PEMBAHASAN

Listeria monocytogenes yang tumbuh padamedia atau pada bahan pangan memerlukan faktor-faktor intrinsik dan ekstrinsik media bakteri tersebut. Kondisi yang diperlukan oleh *L. monocytogenes* dalam pertumbuhannya adalah pH antara 4,39–9,4, suhu -1,5–45°C, aw minimum 0,90, dan nutrisi esensial seperti asam amino (isoleusin, leusin, glutamate, valin, methionin, arginin, sistein, histidin,

dan triptofan), biotin, riboflavin, dan thiamin (Lovett et al.,1990; Donnelly, 2001). Media pengayaan buffered LEB yang digunakan dalam penelitian ini merupakan media tumbuh yang baik bagi *L. monocytogenes* dengan kandungan soya broth, yeast extract, potassium dihydrogen orthophosphate, dan disodium hydrogen orthophosphate dengan pH 7,3± 0,2. Media LSA digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri selain *Listeria*. Tahap isolasi



Gambar 3 Hasil elektroforesis produk PCR multipleks. M: DNA marker 1000 bp; K+: *L. monocytogenes* ATCC 7644; NTC: no template control

dengan metode kultur konvensional dan uji biokimiawi menghasilkan sebanyak 21 isolat dinyatakan sebagai *L. monocytogenes*.

Reaksi PCR untuk identifikasi spesies *L. monocytogenes* dilakukan menggunakan dua pasang primer, yaitu *iap* dan *hlyA*. Primer *iap* didesain dari gen *iap* yang mengkode *invasive associated protein* (p60), sedangkan primer *hlyA* didesain dari gen *hlyA* yang mengkode Listeriolisin O (LLO). Reaksi PCR menunjukkan bahwa 21 isolat diidentifikasi sebagai *L. monocytogenes*, hasil tersebut sesuai dengan hasil identifikasi melalui metode kultur konvensional. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa deteksi *L. monocytogenes* dalam bahan pangan dengan metode PCR baru bisa menunjukkan hasil yang sama dengan metode konvensional bila jumlah minimal bakteri di dalam bahan pangan tersebut adalah 100 sel/gram. Konsentrasi bakteri yang lebih rendah bisa dideteksi dengan melakukan kombinasi metode kultur pengayaan dan PCR. Bila pada bahan makanan yang diuji terdapat konsentrasi sel bakteri mati yang tinggi, dapat terdeteksi melalui uji PCR sehingga dilakukan kultur pengayaan sebelum PCR untuk menambah jumlah sel yang masih hidup saja (Josephson et al., 1993; Manzano et al., 1996). Karakterisasi molekuler melalui analisis hasil pengurutan oligonukleotida dari isolat sampel *L. monocytogenes* yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan terdapat kemiripan sebesar 99% dengan strain-strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data GenBank.

Kejadian listeriosis pada manusia di Indonesia belum pernah dilaporkan, demikian pula penelitian tentang keberadaan *L. monocytogenes* pada susu segar masih sangat terbatas. Yulianti dan Malaka (2013) mengamati pertumbuhan *L. monocytogenes* pada susu dengan penyimpanan pada suhu 4 °C dan menduga adanya perbedaan serotipe bakteri tersebut, namun tidak melakukan penelitian lanjutan untuk identifikasi serotipe. Identifikasi serotipe isolat *L. monocytogenes* yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan dengan metode PCR multipleks dan menunjukkan hasil bahwa keseluruhan 21 isolat termasuk dalam serogrup 2, yaitu serotipe 1/2c dan 3c. Sugiri et al. (2013) melakukan identifikasi serotipe *L. monocytogenes* yang diisolasi dari daging ayam segar di pasar tradisional dan supermarket. Penelitian tersebut juga menggunakan metode PCR multipleks menurut Doumith et al. (2004), namun memberikan hasil yang berbeda, yaitu seluruh isolat *L. monocytogenes* yang diisolasi termasuk dalam serogrup 3, yang terdiri dari serotipe 1/2b, 3b, dan 7. Penentuan serotipe *L. monocytogenes* memiliki implikasi klinis, yaitu diketahui bahwa serotipe 4b menyebabkan listeriosis endemik pada manusia sedangkan serotipe 1/2a, 1/2b, dan 1/2c menjadi penyebab listeriosis sporadik. Penelitian yang dilakukan oleh Goulet et al. (2006) di Perancis menyebutkan bahwa serotipe 4b, 1/2a, 1/2b, dan 1/2c paling banyak diisolasi dari kasus klinis listeriosis pada manusia, dari jumlah tersebut serotipe 4b menjadi penyebab 49% kasus penyakit endemik

foodborne yang dikaitkan dengan *Listeria*. Pada studi yang dilakukan oleh Barbour et al. (2001), *L. monocytogenes* serotipe 4b, 1/2a, 1/2b, dan 1/2c menunjukkan infektivitas yang tinggi setelah inokulasi intragastrik pada hewan mencit dan seluruh serotipe dari *L. monocytogenes*, kecuali serotipe 4a, mampu menyebabkan kematian mencit.

Secara keseluruhan, penelitian ini telah berhasil mendeteksi keberadaan *L. monocytogenes* pada sampel susu segar yang diperoleh dari Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan. Isolasi dan identifikasi yang dilakukan dengan metode kultur konvensional dan PCR menunjukkan hasil yang sama, yaitu sebanyak 21 isolat dari 31 sampel *pool* diidentifikasi sebagai *L. monocytogenes*. Hasil analisis kesamaan urutan oligonukleotida dari isolat sampel *L. monocytogenes* yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan persentase nilai kemiripan sebesar 99% dengan beberapa strain *L. monocytogenes* yang terdapat pada basis data di GenBank. Identifikasi serotipe menunjukkan bahwa keseluruhan 21 isolat tersebut termasuk dalam serogrup 2, yaitu serotipe 1/2c dan 3c.

Dari keseluruhan data dapat disimpulkan bahwa keberadaan *L. monocytogenes* pada susu segar di Kabupaten Enrekang menjadi indikasi perlunya dilakukan pengujian terhadap keberadaan cemaran bakteri tersebut pada susu sapi segar di wilayah lainnya. Penelitian lanjutan yang juga diperlukan adalah karakterisasi virulensi strain *L. monocytogenes* melalui deteksi gen yang berkaitan dengan sifat virulensi. Selain itu, juga perlu dilakukan analisis resiko keberadaan *L. monocytogenes* terhadap keamanan pangan mengingat pentingnya bakteri ini dalam industri pangan dan kesehatan masyarakat.

"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini".

DAFTAR PUSTAKA

- Barbour AH, Rampling A, Hormaeche CE. 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity* 69(7): 4657-4660.
- Borucki MK, Call DR. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41:5537-5540.
- [BPS] Badan Pusat Statistik (ID). 2014. Kabupaten Enrekang dalam angka. Kabupaten Enrekang (ID): BPS Kabupaten Enrekang.
- Donnelly CW. 2001. *Listeria monocytogenes*. Di dalam: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, editor. *Foodborne Disease Handbook 2nd Edition*. New York (US): Marcel Dekker Inc. p213-245.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42(8): 3819-3822.
- Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Reviews* 55(3): 476-511
- Garbutt J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Great Britain (GB): The Bath Press.
- Gorski L. 2008. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Liu D, editor. New York (US): CRC Press.
- Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. 2006. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infection Disease* 14(5): 734-740.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 4th edition*. New Jersey (US): Wiley-Blackwell.
- Hall TA. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*41: 95-98.
- Jacquet C, Guin E, Jeannel D, Cossart P, Rocourt J. 2002. Expression of ActA, Ami, IniB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1461-1466.
- Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3513-3515.
- Lovett J, Wesley IV, Vandermaaten MJ, Bradshaw JG, Francis DW, Crawford RG, Donnelly CW, Messer JW. 1990. High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*53(9): 734-738.
- Manzano M, Cocolin L, Ferroni P, Cantoni C, Comi G. 1996. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*74: 25-30.

- Seeliger HPR, Jones D. 1986. *Listeria*. Di dalam: Sneath PHA, Nair NS, Sharpe NE, Holt JG, Editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 2. Baltimore (US): Williams and Wilkins. p1235-1245.
- Sugiri YD, Kleer J, Golz G, Meeyam T, Chaisowwong W, Alter T. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in fresh poultry products in Bandung, Indonesia. http://disnak.jabarprov.go.id/files_arsip/Chicken_Listeria_Prevalence_Bandung_YONI.pdf. Download: Mei 30, 2014.
- Swetha CS, Rao TM, Krishnaiah N, Kumar V. 2012. Detection of *Listeria monocytogenes* in fish samples by PCR assay. *Annals of Biology Research* 3(4):1880-1884.
- Wiedmann M, Bruce JL, Knorr D, Bodis M, Cole EM, McDowell CI, McDonough PL, Batt CA. 1996. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strain associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1086-1090.
- Yuliati NY, Malaka R. 2013. Karakteristik pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dalam susu selama penyimpanan refrigerator sebagai dasar dalam pencegahan infeksi asal pangan. *Proceeding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan 5: Peningkatan Produktivitas Sumberdaya Peternakan*; 2013 November 12; Bandung, Indonesia. Bandung (ID): Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. p576–585.