

IDENTIFIKASI *Listeria monocytogenes* PADA KERANG HIJAU DAN KERANG DARAH

Identification of Listeria monocytogenes on Green Mussels and Cockle Shell

Winiati Puji Rahayu^{1,2*}, Ristia Rinanti¹, Siti Nurjanah^{1,2}, Caecillia Chrismie Nurwitri¹

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622640 Faks. (0251) 8622986

²SEAFast Center Jalan Puspa No.1 Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Indonesia
Telepon: (0251) 8629903

*Korespondensi: *wini_a@hotmail.com*

Diterima: 23 September 2016/ Review: 13 November 2016/ Disetujui: 20 Desember 2016

Cara sitasi: Rahayu WP, Rinati R, Nurjanah S, Nurwitri CC. 2016. Identifikasi *Listeria monocytogenes* pada kerang hijau dan kerang darah. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 19(3): 329-338.

Abstrak

Kerang hijau (*Perna viridis*) dan kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan salah satu sumber protein hewani yang banyak dibudidayakan di Indonesia karena harganya yang relatif terjangkau. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan *Listeria monocytogenes* pada 27 sampel kerang hijau dan 3 sampel kerang darah di Bogor menggunakan *real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)* dan metode biokimiawi. Gen yang dijadikan target untuk amplifikasi pada *real-time PCR* merupakan gen *hlyA* karena gen ini merupakan gen penentu virulensi yang menghasilkan listeriolysin O. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer forward DG69 (GTG CCG CCA AGA AAA GGT TA) dan primer reverse DG74 (CGC CAC ACT TGA GAT AT) serta sinyal fluorescense menggunakan SYBR Green I. Hasil analisis menggunakan *real-time PCR* menunjukkan hasil negatif *Listeria monocytogenes* pada semua sampel. Sedangkan hasil analisis menggunakan metode biokimiawi, menemukan 1 dari 30 sampel teridentifikasi sebagai *Listeria welshimeri*.

Kata kunci: gen *hlyA*, kerang, *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, *real-time PCR*

Abstract

Green mussel (*Perna viridis*) and cockle shell (*Anadara granosa*) are one of many sources of animal protein which is many cultivated in Indonesia because their price is relatively affordable. This study was conducted to identify the presence of *Listeria monocytogenes* in 27 samples of green mussels and 3 samples of cockle shells using *real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)* and biochemical methods. The target gene for amplification in *real-time PCR* was an *hlyA* gene because this gene was a determinant of virulence genes that produce listeriolysin O. Primers used in this study were forward primer DG69 (GTG CCG GGT AAA AGA CCA TA) and reverse primer DG74 (CGC CAC TGA GAT ACT AT) and fluorescence signals indicator using SYBR Green I. The results of analysis using *real-time PCR* were negative *Listeria monocytogenes* in all samples, while using biochemical methods there was one of 30 samples contaminated by *Listeria welshimeri*.

Keywords : *hlyA* gene, *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, mussel, *real-time PCR*

PENDAHULUAN

Kerang hijau (*Perna viridis*) dan kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan jenis binatang bertubuh lunak yang dapat tumbuh pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$, pH 7,6-8,2 dan

kedalaman antara 5-5,6 m. Kedua jenis kerang ini merupakan jenis kerang yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Data SIDATIK (2015) menunjukkan produksi kedua kerang tersebut terus mengalami kenaikan pada tahun

2010 hingga 2012. Salah satu alasan kerang hijau banyak dikembangkan yaitu karena kerang hijau merupakan sumber protein hewani yang harganya relatif terjangkau. Purwaningsih *et al.* (2011) melaporkan bahwa kandungan protein kerang hijau yaitu $9,17 \pm 0,16$ dalam 100 gram bahan segar.

Kerang hijau dan kerang darah sebagai salah satu pangan yang berasal dari laut (*fresh seafood*) lebih mudah mengalami kerusakan dibandingkan dengan komoditi segar lainnya (Masniyom 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Masniyom *et al.* (2011) menunjukkan bahwa umur simpan kerang pada suhu 4°C adalah 6 hari. Beberapa studi membahas tentang risiko kerang hijau dan kerang darah terhadap kesehatan karena kerang hijau dan kerang darah dapat mengakumulasi kontaminan-kontaminan dalam air, misalnya bakteri patogen dan logam berat dari area tempat hidupnya (Wulandari *et al.* 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Papadopoulou *et al.* (2006) menunjukkan bahwa beberapa jenis bakteri yang mengontaminasi kerang antara lain *Escherichia coli* (100%), *P. vulgaris* (96%), *P. mirabilis* (92%), *Y. enterocolitica* (40%), *S. aureus* (56,6%), *Pseudomonas fluorescens* (26,6%), dan *Listeria innocua* (3,3%). Bakteri patogen yang paling banyak diteliti adalah *E. coli* dan bakteri koliform. Sedangkan penelitian mengenai keberadaan bakteri patogen lain seperti *Listeria monocytogenes* pada kerang masih belum banyak dilakukan. Padahal *L. monocytogenes* berpotensi menjadi kontaminan pada produk perikanan laut (Beleneva 2011). Kontaminan *L. monocytogenes* dapat berasal dari ikan segar, kerang, ikan asap, dan makanan siap santap yang disimpan lama dalam *refrigerator* (Ariyanti 2010). Peningkatan kasus listeriosis di Finlandia pada tahun 2010 menunjukkan bahwa industri perikanan memiliki risiko yang tinggi terhadap kontaminasi *L. monocytogenes* (Nakari *et al.* 2014).

Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji keberadaan *L. monocytogenes* pada kerang hijau dan kerang darah untuk mencegah wabah listeriosis yang disebabkan oleh kerang hijau dan kerang darah. Salah satu metode cepat, spesifik

dan sensitif membedakan *L. monocytogenes* dari spesies *Listeria* lainnya adalah dengan menggunakan *real-time Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Klein 2002). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keberadaan *L. monocytogenes* dalam kerang hijau dan kerang darah di daerah Bogor menggunakan metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (PCR), selain biokimiawi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan sebagai sampel di dalam penelitian ini adalah 27 sampel kerang hijau dan 3 sampel kerang darah di daerah Bogor. Alat yang digunakan yaitu rt-PCR Swift™ Spectrum 48, *sentrifuge*, *water bath*, *magnetic stirrer*, oven, inkubator, dan autoklaf.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan membuat kurva pertumbuhan *L. monocytogenes* ATCC 7644 selama 24 jam dengan metode cawan sebar. Identifikasi keberadaan *L. monocytogenes* dilakukan dengan menggunakan *real-time* PCR dan metode biokimiawi.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Tahapan persiapan kultur murni *L. monocytogenes* meliputi pengecekan kultur murni *L. monocytogenes* ATCC 7644 dan konsentrasi kultur murni yang telah diinkubasi selama 18 jam dengan metode overnight culture (Jones, D'Orazio 2013). Sedangkan pada pembuatan kurva pertumbuhan *L. monocytogenes* dilakukan dengan menyiapkan kultur murni *L. monocytogenes* berjumlah 10^2 CFU/mL. Sebanyak 1 mL kultur murni dikayakan pada 9 mL media LEB pada suhu 30°C. Kemudian kultur dihitung pertumbuhannya pada 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 6; 9 dan 24 jam dengan menggunakan metode perhitungan cawan sebar.

Identifikasi *Listeria monocytogenes* Pada Kerang Menggunakan *Real-Time* PCR

Identifikasi *L. monocytogenes* dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi tahapan persiapan sampel, ekstraksi DNA,

Tabel 1 Identitas sampel kerang hijau dan kerang darah yang digunakan

No. Sampel	Kode Sampel	Jenis Sampel	Kondisi	Asal sampel
1	RE28	Kerang hijau	A	Pasar Bogor
2	RE01	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
3	RE02	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
4	RE03	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
5	RE04	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
6	RE05	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
7	RE06	Kerang hijau	B	Rumah makan di Dramaga
8	RE07	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
9	RE08	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
10	RE09	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
11	RE10	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
12	RE11	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
13	RE12	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
14	RE13	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
15	RE14	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
16	RE15	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
17	RE16	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
18	RE17	Kerang hijau	C	Pasar Bogor
19	RE18	Kerang hijau	C	Pasar Batu Tulis
20	RE19	Kerang hijau	C	Pasar Batu Tulis
21	RE20	Kerang hijau	C	Pasar Anyar
22	RE21	Kerang hijau	C	Pasar Anyar
23	RE22	Kerang hijau	C	Pasar Anyar
24	RE25	Kerang hijau	C	Pasar Anyar
25	RE29	Kerang hijau kulit	A	Pasar Anyar
26	RE24	Kerang hijau kulit	C	Pasar Anyar
27	RE27	Kerang hijau kulit	C	Pasar Anyar
28	RE30	Kerang darah	A	Pasar Anyar
29	RE23	Kerang darah	C	Pasar Anyar
30	RE26	Kerang darah	C	Pasar Anyar

Keterangan: A = mentah; B = rebus bersama bumbu; C = rebus tanpa bumbu

Tabel 2 Komposisi bahan pada amplifikasi *real-time* PCR (Choi dan Hong 2003)

Bahan	Jumlah
DyNamo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	10 μ L
Water (Nuclease Free)	6 μ L
Template DNA	2 μ L
Primer forward DG69 (GTG CCG CCA AGA AAA GGT TA)	500 nM
Primer reverse DG74 (CGC CAC ACT TGA GAT AT)	500 nM

Tabel 3 Kondisi *running* pada amplifikasi *real-time* PCR (Choi dan Hong 2003)

Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Denaturasi awal	94	5 menit	1
<i>Denaturasi</i>	94	45 detik	
Annealing	55	45 detik	30
Extension	72	45 detik	
<i>Entension akhir</i>	72	7 menit	1
Tahap melting	72-94	10 detik	1

(kenaikan suhu tiap 0,5°C) (tiap kenaikan suhu 0,5°C)

elektroforesis, dan amplifikasi pada *real-time* PCR. Pada tahap persiapan sampel, 30 sampel terdiri dari 6 sampel kerang yang sudah dimasak dengan bumbu, 21 sampel direbus tanpa bumbu selama 10-20 menit, dan 3 sampel masih mentah (Tabel 1). Selanjutnya sampel dilakukan pengayaan pada media LEB yang mengacu pada metode BAM (2011) dengan modifikasi waktu pengayaan selama 18 jam.

Tahapan ekstraksi DNA yang dilakukan mengacu pada penelitian Sambrook, Russel (2001), dengan menggunakan metode fenol: kloroform. Tahapan ini bertujuan memisahkan DNA dari molekul-molekul lain seperti protein, lipid, dan polisakarida.

Hasil ekstraksi DNA di elektroforesis dengan menggunakan 1,5% gel agarose pada tegangan 100 volts. Setelah dimigrasi, gel berisi DNA direndam dalam larutan *Ethidium Bromida* (EtBr) kemudian dicuci menggunakan air selama kurang lebih 10 menit. Setelah itu, gel dimasukkan ke dalam gelldoc untuk melihat pita DNA genom. Pada penelitian ini, hanya beberapa sampel yang dielektroforesis dan diambil secara acak.

Tahapan amplifikasi dengan *real-time* PCR (Bio Rad, USA) dilakukan untuk mengidentifikasi cemaran *L. monocytogenes* pada sampel kerang hijau dan kerang darah. Komposisi bahan dan kondisi *running real-time* PCR mengacu pada penelitian Choi dan Hong (2003) yang diperlihatkan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Pada penelitian ini, gen yang dijadikan target untuk amplifikasi pada *real-time* PCR merupakan gen *hlyA* karena gen ini merupakan gen penentu virulensi *L. monocytogenes* yang menghasilkan listeriolysin O. Primer yang digunakan pada

penelitian ini adalah primer forward DG69 (GTG CCG CCA AGA AAA GGT TA) dan primer reverse DG74 (CGC CAC ACT TGA GAT AT) serta sinyal fluorescence menggunakan SYBR Green I yang mengacu pada Choi dan Hong (2003).

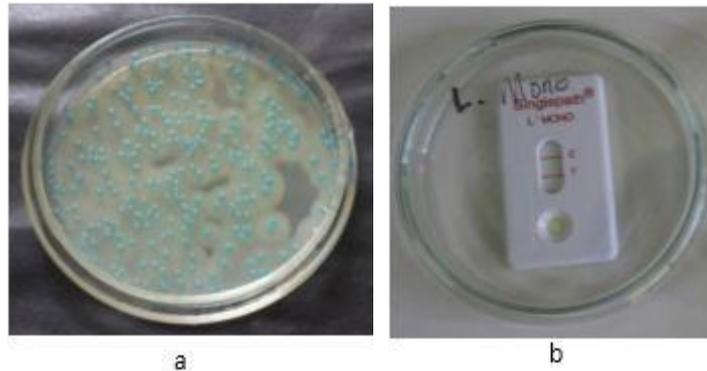
Identifikasi *Listeria* spp. Menggunakan Metode Biokimiawi

Identifikasi *Listeria* spp. menggunakan metode biokimiawi dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu tahap isolasi pada media ALOA (FDA 2011), uji katalase (Purwohadisantoso *et al.* 2009), uji pewarnaan Gram (FDA 2001), uji motilitas (BSN 2009), pewarnaan spora (Sunatmo 2007), uji fermentasi karbohidrat (FDA 2011) dan uji hemolitik (FDA 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN Kurva Pertumbuhan *L. monocytogenes* ATCC 7644

Kultur murni *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 yang digunakan dalam penelitian ini mula-mula dicek kemurniannya sebelum diuji dan dilihat kurva pertumbuhannya. Gambar 1 menunjukkan hasil positif pengujian pertumbuhan *L. monocytogenes* pada media ALOA (48 jam) dan menggunakan kit immuno assay. Seluruh koloni yang tumbuh pada media ALOA berwarna biru kehijauan dengan dikelilingi halo berwarna putih. Ciri-ciri ini sesuai dengan ciri-ciri koloni *L. monocytogenes* yang tumbuh pada media ALOA (Becker *et al.* 2006).

Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) adalah media kromogenik yang mendeteksi keberadaan *Listeria* spp. Komponen kromogenik yang terdapat pada



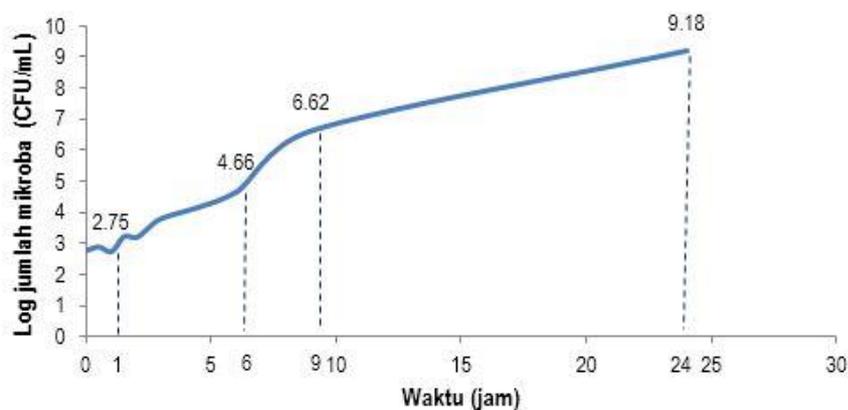
Gambar 1 Pertumbuhan kultur murni *L. monocytogenes* pada media ALOA (48 jam) (a), uji positif *L. monocytogenes* pada kit immuno assay (b)

media ini, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (X-glc), bereaksi dengan aktivitas β -glucosidase yang dihasilkan oleh *Listeria* spp. dan menghasilkan koloni berwarna biru (Becker *et al.* 2006). Namun beberapa *Bacillus* sp. dapat tumbuh pada media ALOA dan membentuk koloni berwarna biru (Liu 2008). *L. monocytogenes* juga diuji menggunakan kit immuno assay menunjukkan hasil yang positif.

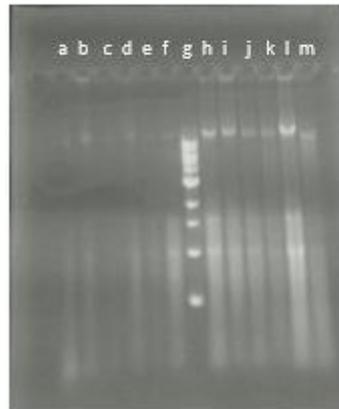
Waktu pengayaan *L. monocytogenes* yang biasa digunakan untuk metode biokimiawi yang mengacu pada metode BAM (2011) adalah 48 jam. Namun, kerang merupakan salah satu pangan yang mudah rusak dimana umur simpan kerang yang disimpan pada suhu 4°C adalah 6 hari (Masniyom *et al.* 2011), sedangkan *L. monocytogenes* sebanyak 103 CFU/mL dapat terdeteksi pada *real-time* PCR (Choi dan Hong 2003). Oleh karena itu, dilakukan modifikasi waktu pengayaan agar terjadi peningkatan jumlah *L. monocytogenes* minimal sebanyak 3 siklus log. Gambar 2

menunjukkan kurva pertumbuhan kultur murni *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang ditumbuhkan pada media LEB selama 24 jam. Pada Gambar 3, terlihat bahwa selama inkubasi 9 jam, jumlah kultur murni *L. monocytogenes* ATCC 7644 meningkat sebanyak 3,87 siklus log. Pada penelitian ini, diasumsikan jumlah awal *L. monocytogenes* pada sampel berjumlah sangat kecil (± 100), oleh karena itu dipilih waktu pengayaan sehingga jumlah *L. monocytogenes* meningkat lebih dari 3 siklus log. Jumlah *L. monocytogenes* sebanyak 103 CFU/g sudah dapat dideteksi oleh *real-time* PCR (Choi dan Hong 2003). Berdasarkan hal tersebut, waktu inkubasi sampel yang diperlukan minimal selama 9 jam, sedangkan pada penelitian ini dipilih waktu inkubasi selama 18 jam karena waktu tersebut merupakan waktu paling sesuai dengan jam kerja di dalam laboratorium yang digunakan selama penelitian.

Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah suhu, tekanan



Gambar 2 Kurva hubungan log jumlah mikroba dan waktu



- Keterangan :
- a : sampel RE02
 - b : sampel RE04
 - c : sampel RE06
 - d : sampel RE08
 - e : sampel RE10
 - f : sampel RE12
 - g : DNA ladder 1 kb
 - h : sampel RE13
 - i : sampel RE17
 - j : sampel RE19
 - k : sampel RE21
 - l : sampel RE27
 - m : sampel RE29

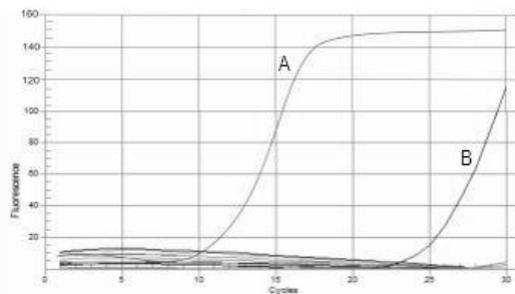
Gambar 3 Hasil elektroforesis DNA bakteri dari beberapa sampel

osmotik, pH, oksigen, radiasi, dan media kultur yang digunakan. Media yang digunakan merupakan media LEB, dimana pada media tersebut ditambahkan *Listeria selective enrichment supplement* yang mengandung asam nalidixic dan acrilavine yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain selain *Listeria*. Sedangkan suhu pengayaan yang digunakan mengacu pada FDA (2011) adalah 30°C. Suhu 30°C merupakan suhu yang paling optimum untuk menumbuhkan *L. monocytogenes*, sedangkan mikroba kompetitor lain yang ada di dalam pangan

tidak dapat tumbuh optimum pada suhu tersebut (Liu 2008).

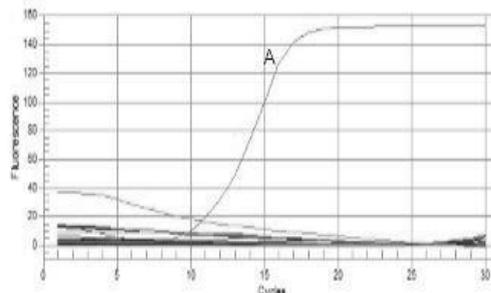
Keberadaan *L. monocytogenes* Pada Kerang Menggunakan *Real-Time PCR*

Real-time Polymerase Chain Reaction (*real-time PCR*) merupakan suatu metode yang cepat, sensitif dan spesifik untuk mendeteksi keberadaan suatu mikroba dengan memanfaatkan DNA mikroba yang dideteksi. Gambar 3 menunjukkan hasil elektroforesis pada beberapa hasil ekstraksi DNA yang memperlihatkan adanya pita yang



a

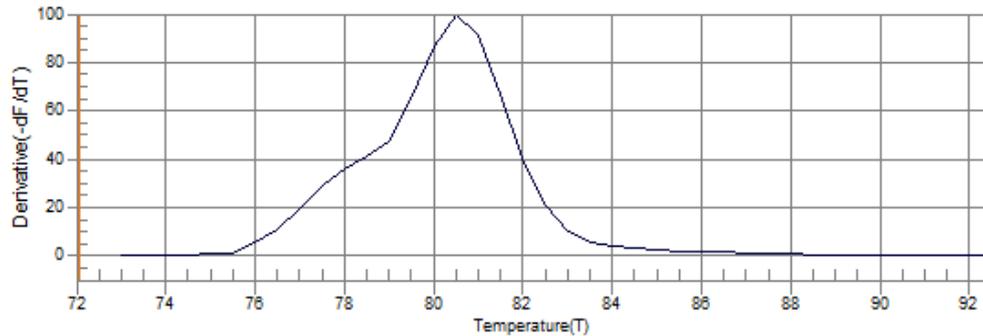
- Keterangan :
- A = kontrol positif *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
 - B = sampel RE02



b

- Keterangan :
- A = kontrol positif *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Gambar 4 Hasil amplifikasi sampel pada real-time PCR (a) sampel 1-6 (b) sampel 7-30



Gambar 5 Kurva pelelehan sampel RE02

membuktikan tahapan ekstraksi DNA yang dilakukan berhasil. DNA tersebut kemudian siap untuk diamplifikasi pada *real-time* PCR untuk menguji keberadaan DNA *L. monocytogenes* pada sampel. Hasil amplifikasi pada *real-time* PCR menunjukkan tidak adanya keberadaan *L. monocytogenes* pada 30 sampel kerang. Hal ini dibuktikan oleh tidak terbentuknya kurva sigmoid pada pengujian menggunakan *real-time* PCR (Gambar 4).

Kurva sigmoid hanya dibentuk oleh kontrol positif *L. monocytogenes*. Gambar 4a menunjukkan kurva amplifikasi untuk sampel 1 sampai 6 dimana sampel RE02 teramplifikasi dengan nilai $Ct > 25$. Sedangkan suhu pelelehan (T_m) yang dimiliki oleh sampel tersebut sebesar 81°C (Gambar 5). Nilai T_m ini mendekati nilai T_m untuk *L. monocytogenes*, yaitu 79°C (Mutsyahiddan *et al.* 2015). Nilai T_m ini dicurigai sebagai *L. monocytogenes* sehingga dilakukan pengujian sampel menggunakan elektroforesis. Berdasarkan hasil pengujian menggunakan elektroforesis, pita hasil elektroforesis sampel tersebut terlihat pada ukuran <500 bp. Padahal ukuran untuk *L. monocytogenes* adalah 635 bp (Choi dan Hong 2003). Berdasarkan hal tersebut, maka disimpulkan bahwa sampel tersebut tidak mengandung *L. monocytogenes* tetapi diduga ada *Listeria* spp. yang lain.

Selain terdapat di beberapa produk perikanan, *Listeria* juga dapat mengontaminasi selama proses pemasakan apabila sanitasi yang dilakukan buruk atau terjadi kontaminasi setelah proses pemasakan. Hasil negatif *L. monocytogenes* terhadap 30 sampel kerang menunjukkan *L. monocytogenes* tidak terdapat pada sampel kerang yang masih mentah dan tidak terdapat kontaminasi terhadap sampel

kerang pada saat pemasakan serta setelah proses pemasakan.

Produk perikanan atau produk kerang-kerangan terkontaminasi *L. monocytogenes* dengan jumlah yang rendah yaitu sekitar 4,5 atau 5,3% (Rodas -Suarez *et al.* 2006; Bou-m'handi *et al.* 2007). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Beleneva (2011) menunjukkan bahwa pada sampel kerang hijau yang ditelitinya hanya terdeteksi *S. aureus* dan tidak ada data yang menunjukkan keberadaan *L. monocytogenes* pada sampel kerang hijau. Salah satu penyebab rendahnya kontaminasi *L. monocytogenes* pada kerang-kerangan adalah adanya bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dihasilkan oleh kerang-kerangan. Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan Pinto *et al.* (2009) yang menunjukkan keberadaan anti-*Listeria* bakteriosin yang diisolasi dari kerang. Pada penelitian tersebut, terdapat dua jenis bakteriosin yang diproduksi oleh *Enterococcus faecium* dan *Pediococcus pentosaceus* yang telah terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *L. monocytogenes*.

Keberadaan *Listeria* spp. Menggunakan Metode Biokimiawi

Deteksi keberadaan *L. monocytogenes* menggunakan *real-time* PCR menunjukkan hasil negatif pada semua sampel. Namun hasil ekstraksi DNA menunjukkan adanya DNA mikroba pada sampel. Selain itu, ada DNA yang teramplifikasi pada *real-time* PCR. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel terdapat mikroba lain selain *L. monocytogenes* yang mengontaminasi sampel dan terdapat kemungkinan adanya *Listeria* jenis lain yang mengontaminasi, oleh karena itu dilakukan

Tabel 4 Hasil uji fermentasi karbohidrat dan uji hemolitik

Jenis sampel	Man-nitol	Xylo-sa	Rham-nosa	Glu-kosa	Hemo-litik	Kesimpulan
Kerang hijau matang tanpa cangkang	-	+	-	+	-	<i>Listeria welshimeri</i>
Total sampel terdapat <i>Listeria welshimeri</i> /(% sampel)						1 (3,3%)

identifikasi menggunakan metode biokimiawi untuk mendeteksi *Listeria* spp. yang lain.

Pengujian yang dilakukan pada 30 sampel menunjukkan terdapat 20 sampel yang diduga terkontaminasi *Listeria* spp. Hal ini ditandai oleh koloni berwarna biru yang tumbuh pada media ALOA. Jumlah isolat yang didapatkan dari 20 sampel yang diduga sebagai *Listeria* spp. yaitu 50 isolat yang selanjutnya di uji katalase, pewarnaan Gram, uji motilitas dan uji pewarnaan spora.

Hasil analisis terhadap 50 isolat yang diteliti menunjukkan terdapat 43,3% sampel yang menunjukkan katalase positif, Gram positif, dan berbentuk batang pendek atau kokus. Kemudian terdapat 20% sampel yang menunjukkan motilitas positif dan hanya 3,3% sampel yang tidak membentuk spora. Berdasarkan data tersebut, dapat dilihat bahwa dari 30 sampel yang telah diidentifikasi, hanya terdapat 3,3% sampel yang memiliki ciri-ciri *Listeria* spp. (Ariyanti 2010). Selanjutnya, isolat diuji menggunakan uji fermentasi karbohidrat dan uji hemolitik. Hasil uji fermentasi karbohidrat dan uji hemolitik ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa isolat *Listeria* spp. yang telah ditemukan merupakan *Listeria welshimeri*. Sampel yang terkontaminasi tersebut merupakan sampel kerang hijau yang telah dihilangkan cangkangnya selama proses penjualan dan telah mengalami proses perebusan. Kontaminasi dapat terjadi akibat proses pengupasan kerang hijau yang kurang higienis, lingkungan tempat berjualan kurang bersih, atau karena jumlah mikroba awal yang tinggi. *Listeria welshimeri* sendiri merupakan jenis *Listeria* spp. yang tidak memiliki kemampuan hemolisis (Volokhov *et al.* 2006). Bakteri ini juga digolongkan sebagai bakteri non-patogen (Hein *et al.* 2008).

Pada penelitian ini, selain ditemukan *Listeria welshimeri*, ditemukan pula isolat yang diduga sebagai *Bacillus* spp. *Bacillus* spp. merupakan salah satu bakteri yang dapat tumbuh pada media ALOA dan dapat membentuk koloni berwarna biru, contohnya *Listeria* spp. Selain itu, *Bacillus* spp. juga merupakan bakteri berkatalase positif. Hasil elektroforesis DNA bakteri dari beberapa sampel Gram positif dan berbentuk batang serta bersifat motil (Ariyanti 2010). Sifat-sifat tersebut sangat menyerupai sifat *Listeria* spp. Hanya satu sifat yang dapat membedakan antara *Bacillus* spp. dan *Listeria* spp. yakni pada kemampuannya dalam membentuk spora. *Listeria* spp. merupakan bakteri yang tidak dapat membentuk spora (Ariyanti 2010) sedangkan *Bacillus* spp. dapat membentuk spora (Waites *et al.* 2008). Penelitian ini ditemukan 20% sampel yang berkatalase positif, Gram positif, berbentuk batang, bersifat motil, dan membentuk spora yang diduga sebagai *Bacillus* spp.

KESIMPULAN

Tidak ditemukan *L. monocytogenes* pada 30 sampel kerang hijau dan kerang darah dengan menggunakan metode *real-time* PCR. Sedangkan berdasarkan metode biokimiawi, ditemukan *Listeria welshimeri* sebanyak 3,3% dari 30 sampel yang telah dianalisis. *Listeria welshimeri* adalah jenis bakteri non-patogen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kemenristek DIKTI, yang telah mendanai penelitian ini dengan skema Hibah Kompetensi tahun 2015 dengan No. Kontrak 083/SP2H/PL/Dit. Litabmas/2015 tanggal 05 Februari 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti T. 2010. Bakteri *Listeria monocytogenes* sebagai kontaminan makanan asal hewan (*foodborne disease*). *Wartazoa* 20 (2) : 94-102.
- Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis GDW, Holzapfel WH. 2006. Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology* 109: 127-131.
- Beleneva IA. 2011. Incidence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from the Japan and South China seas. *Marine Pollution Bulletin* 62: 382-387.
- Bou-m'handi N, Jacquet C, Marrakchi AE, Martin P. 2007. Phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a marine environment in Morocco. *Foodborne Pathogens and Disease* 4 (4): 409-417.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. SNI 7303:2009
- Choi WS, Hong CH. 2003. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. *International Journal of Food Microbiology* 84: 79-85.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2001. BAM R32: Gram Stain. Bacteriological Analytical Manual Online.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. *Listeria monocytogenes*. Chapter 10 Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In Bacteriological Analytical Manual Online.
- Hain T, Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, Ghai R, Chatterjee SS, Domann E, Karst U, Goesmann A, Bekel T, *et al.* 2006. Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 188(21): 74015-7415.
- Jones GS, D'Orazio SEF. 2013. *Listeria monocytogenes*: cultivation and laboratory maintenance. *Curr Protoc Microbiol* 5(31): 9B.2.1-9B.2.7.
- Liu D. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Masniyom P. 2011. Detrioration and shelf-life extention of fish and fishery products by modified atmosphere packaging. *Songklanakarin Journal Science Technology* 33(2): 181-192.
- Mutsyahiddan AMA, Rahayu WP, Nurjanah S. 2016. Detection of *Listeria monocytogenes* in indigenous snack using *real-time* polymerase chain reaction. *Malaysian Journal of Microbiology* 12(2): 177-181.
- Nakari UM, Rantala L, Pihlajasaari A, Toikkanen S, Johansson T, Hellsten C, *et al.* 2014. Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010. *Epidemiol. Infect* 1-9.
- Papadopoulou C, Economou E, Zakas G, Salamoura C, Dontorou C, Apostolou J. 2006. Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. *Journal of Food Quality* 30: 28-42.
- Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs PA. 2009. Characterization of anti-*Listeria bacteriocins* isolated from shellfish : Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* 129: 50-58.
- Purwaningsih S, Salamah E, Merlinda KD. 2011. Penurunan kandungan gizi mikro kerang hijau (*Perna viridis*) akibat metode pemasakan yang berbeda. *Jurnal Sumberdaya Perairan* 5(2): 19-22.
- Purwohadisantoso K, Elok Z, Ella S. 2009. Isolasi bakteri asam laktat dari sayur kubis yang memiliki kemampuan penghambatan bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian* 10 (1): 19-27.
- Rodas-Suárez OR, Flores-Pedroche JF, Betancourt-Rule JM, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2006. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from

- oysters, fish, and estuarine water. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (11) : 7410–7412.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Haror Laboratory Press.
- [SIDATIK] Sistem Informasi Diseminasi Data Statistik Kelautan dan Perikanan. 2015. Volume produksi perikanan tangkap di laut menurut jenis ikan. [Internet]. [diunduh 2015 Mei 14].
- Sunatmo TI. 2007. *Eksperimen Mikrobiologi Dalam Laboratorium*. Bogor: Penerbit Ardy Agency.
- Volokhov D, George J, Anderson C, Duvall RE, Hitchins AD. 2006. Discovery of natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates. *Applied And Environmental Microbiology* 72(4): 2349-2448.
- Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Highton G. 2008. *Industrial Microbiology an Introduction*. London: Blackwell Publisher.
- Wulandari SY, Bambang Y, Gunawan WS, Ken S. 2009. Kandungan logam berat Hg dan Cd dalam air, sedimen, dan kerang darah (*Anadara granossa*) dengan menggunakan metode analisis pengaktifan neutron (APN). *Jurnal Ilmu Kelautan* 14 (3): 170-175.