

PROSIDING

Seminar Nasional PATPI
Yogyakarta, 2-3 Agustus 2006

**Pengembangan Teknologi Pangan
untuk Membangun Kemandirian Pangan**

Kelompok Mikrobiologi dan Bioteknologi



Diselenggarakan oleh:
Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia
bekerjasama dengan
Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Gadjah Mada
Pusat Studi Pangan dan Gizi - Universitas Gadjah Mada
didukung oleh
PT. ISM Bogasari Flour Mills

Daftar Isi Makalah

No.	Judul Makalah	Penulis	Halaman
1	Pengembangan Pangan Multifungsional Berbasis Bekatul	Elok Zubaidah	M1-10
2	Peningkatan Mutu Makanan Sapihan Tradisional dengan Bakteri Asam Laktat	I Wayan Sweca Yasa, Nazaruddin dan Satrijo Saloko	M11-18
3	Potensi Talas (<i>Colocasia esculenta</i> (L) Schott) dan Sukun (<i>Artocarpus altilis</i> (Park) Fosberg) untuk Mendukung Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Probiotik	Lilis Nuraida, Nurheni Sri Palupi, Dian Ekasari Putri dan Ni Wayan Y. Widayanti	M19-28
4	Stabilitas Starter Kering Semprot Bakteri Asam Laktat selama Penyimpanan dan Kemampuannya dalam Menurunkan Kadar Laktosa pada Fermentasi Yogurt	Tyas Utami, Kasmiati, Eni Harmayani dan Endang S Rahayu	M29-36
5	Mikro Enkapsulasi Minyak Atsiri Kulit Kayu Manis (<i>Cinnamomum burmannii</i> Bl.) dan Evaluasi Sifat Antimikrobiannya pada <i>Penicillium funiculosum</i> Thom FRR 6069	Bambang Kunarto, Dewi Larasati dan Siti Rukhanah	M37-45
6	Identifikasi Prevalensi dan Pengaruh Klorin terhadap Kulturabilitas Sel <i>Campylobacter jejuni</i> dalam Bahan Pangan	Harsi D. Kusumaningrum, Suliantari dan Siti Nurjanah	M46-51
7	Study of the Efficacy of Peroxyacetic Acid for Inactivating <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Escherichia coli</i> On Black Tiger Shrimp (<i>Penaeus monodon</i>)	Indun Dewi Puspita and Warapa Mahakarnchanakul	M52-62
8	Pengaruh Konsentrasi Starter dan Sukrosa Terhadap Beberapa Karakteristik Kefir	Debby M. Sumanti, Tati Sukarti dan Rosalia Haryani K	M63-72
9	Aktivitas Antimikrobia Ekstrak Cassia Vera	Fauzan Azima	M73-79
10	Kajian Aktivitas Antikapang dari Ekstrak Biji Atung (<i>Parinarium glaberimum</i> Hassk) dan Rimpang Lengkuas (<i>Alpinia galanga</i> L. Swartz) serta Aplikasinya pada Ikan Patin (<i>Pangasius sp</i>) Kering	Salnida Yuniarti Lumbessy	M80-88
11	Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak Herba Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Segar, Ekstrak Bubuk Kering dan "Effervescent" Pegagan	Tri Dewanti W., Widya Dwi R. dan Anjar Kurniawan	M89-96
12	Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Secang (<i>Caesalpinia sappan</i> L.) pada Bungkil Kacang Tanah terhadap Pertumbuhan Fungi dan Aktivitas Antioksidan Selama Penyimpanan	Wahyu Widowati dan Ratu Safitri	M97-112
13	Karakterisasi Amilase Alkalin dari Kultur Isolat Cabuk	Choirul Anam dan Endang Setyorini	M113-118
14	Multizymes Halotolerant FP-133 untuk Preparasi Ekstrak Kamir	Endang Setyorini, Choirul Anam dan MAM Andriani	M119-123
15	Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Kitinase dari <i>Vibrio anguillarum</i> dengan Metode Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat	Noor Harini	M124-132
16	Membandingkan Kinerja Protease Biduri dengan Protease Komersial	Yuli Witono, Achmad Subagio, Tri Susanto dan Simon Bambang W.	M133-142

Identifikasi Prevalensi dan Pengaruh Klorin terhadap Kulturabilitas Sel *Campylobacter jejuni* dalam Bahan Pangan

HARSI D. KUSUMANINGRUM, SULJANTARI DAN SITI NURJANAH

[Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, e-mail: h_kusumaningrum@ipc.ac.id]

ABSTRAK

Campylobacter jejuni merupakan bakteri penyebab utama infeksi yang disebabkan oleh makanan (*foodborne disease*) di negara-negara Eropa pada lima tahun terakhir. Bakteri ini terutama ditemukan mengkontaminasi produk daging unggas. Dalam penanganan daging ayam segar seringkali produk mendapat perlakuan pencucian dengan klorin dengan konsentrasi 10 – 100 ppm. Larutan klorin yang umumnya digunakan sebagai desinfektan, dapat mempengaruhi viabilitas dan kulturabilitas sel mikroba. Viabilitas sel akan menurun jika terjadi kerusakan membran sel, kerusakan enzim, atau bagian sel yang lain. Faktor-faktor yang mempengaruhi efektifitas larutan klorin dalam penurunan viabilitas sel antara lain adalah konsentrasi, suhu dan masa kontak. Di Indonesia, data-data pencemaran maupun perilaku *Campylobacter* pada produk unggas belum banyak ditemukan. Pola pencemaran bahan pangan oleh bakteri patogen ini sangat diperlukan untuk membuat kebijakan peningkatan mutu dan keamanan produk pangan. Pada penelitian tahap pertama dilakukan identifikasi prevalensi *Campylobacter jejuni* pada daging ayam segar dengan mengambil contoh dari pasar tradisional/swalayan dan melakukan pemupukan pada media spesifik agar Columbia-blood dengan suplemen selektif preston, kemudian diinkubasi dalam keadaan mikroaerofilik, pada suhu 42°C. Selanjutnya, pada tahap kedua dikaji kulturabilitas *Campylobacter jejuni* yang terdapat pada daging ayam yang mendapat perlakuan pencucian dengan larutan klorin. Kulturabilitas dianalisa dengan menumbuhkan sel pada media spesifik. Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa 30% dari contoh yang dianalisa diduga tercemar oleh *Campylobacter jejuni*. Analisis mikroskopi menunjukkan bahwa morfologi sel yang ditemukan adalah sel masa transisi yang mengalami perubahan dari bentuk spiral ke bentuk kokoid. Luaran penelitian ini berupa prevalensi pencemaran *Campylobacter jejuni* pada produk unggas dan pengaruh paparan klorin terhadap kulturabilitas sel *Campylobacter jejuni*.

Kata Kunci: Prevalensi, *Campylobacter jejuni*, Klorin, Kulturabilitas Sel

PENDAHULUAN

Campylobacter jejuni adalah bakteri Gram negatif yang tidak membentuk spora, berbentuk spiral atau kokoid dan bersifat motil. Bakteri ini tumbuh optimum pada suhu 42°C, dalam keadaan mikroaerofilik (6% oksigen) (McClure dan BlackBurn, 2003). Spesies *Campylobacter* pertama kali diisolasi dari feses manusia yang menderita diare pada tahun 1971 (Altekruse et al, 1999). Pada lima tahun terakhir, *Campylobacter jejuni* merupakan penyebab utama gastroenteritis bakterial pada manusia di banyak negara (Kusumaningrum et al, 2004; WHO, 2001). Empat sumber utama penyebab infeksi makanan adalah daging mentah atau setengah matang (terutama unggas), air, susu segar dan hewan piaraan (Altekruse et al, 1999; Bhaduri dan Cottrell, 2004). Di Amerika dan Inggris pernah dilaporkan bahwa tingkat pencemaran *Campylobacter jejuni* pada daging ayam di retail mencapai 60%.

Meskipun campylobacteriosis (penyakit gastroenteritis yang disebabkan oleh *C. Jejuni*) sering berkaitan dengan konsumsi daging, terutama daging unggas, *C. Jejuni* juga diisolasi dari sayuran segar dan menyebabkan penyakit. Brandl et al (2004) mengidentifikasi bahwa *C. jejuni* dapat bertahan hidup pada daun tanaman yang disimpan pada suhu 10° C untuk beberapa minggu. Adanya kerusakan jaringan tanaman dan cemaran tanah dapat memperpanjang waktu survival. Kondisi ini diduga merupakan bagian dari siklus kontaminasi *C. jejuni* di lingkungan dan terkait dengan terjadinya kasus sporadis campylobacteriosis yang disebabkan karena mengkonsumsi sayuran (Brandl et al, 2004).

Proses penanganan bahan pangan segar seperti daging ayam dan sayuran segar seringkali melibatkan tahap perlakuan pencucian dengan klorin dengan konsentrasi 10-100 ppm. Paparan dengan larutan klorin dapat mempengaruhi viabilitas dan kulturabilitas sel cemaran mikroba yang terdapat dalam bahan pangan. Viabilitas sel akan menurun jika terjadi kerusakan membran sel, kerusakan enzim, atau bagian sel yang lain. Kerusakan sebagian dari bagian-bagian sel akan berakibat pada menurunnya kulturabilitas sel bakteri pada media tumbuh.

Beberapa peneliti telah mengkaji mekanisme klorin dalam inaktivasi bakteri. Senyawa turunan sodium hipoklorit yang terbentuk jika dilarutkan dalam air yaitu asam hipoklorat (HOCl) merupakan oksidator kuat yang dapat merusak dinding sel dan mengganggu fungsi membran sel. Walaupun demikian, mekanisme terhadap inaktivasi *Campylobacter*, terutama dengan dosis yang diijinkan untuk penanganan bahan segar (sekitar 10 ppm), masih belum banyak diketahui. Luaran penelitian ini akan berupa pola pencemaran *Campylobacter jejuni* pada bahan pangan di Indonesia dan pengaruh paparan klorin terhadap viabilitas sel *Campylobacter jejuni*. Di Indonesia, data-data pencemaran maupun perilaku *Campylobacter* pada bahan pangan masih belum banyak ditemukan. Pola pencemaran bahan pangan oleh bakteri patogen ini sangat diperlukan untuk membuat kebijakan peningkatan mutu dan keamanan produk pangan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan peralatan

Bahan utama yang akan digunakan adalah sayur selada dan daging ayam segar bagian dada. Bakteri uji yang digunakan adalah dua jenis spesies *Campylobacter jejuni* yang merupakan koleksi dari Balai Penelitian Veteriner Bogor. Media dan bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain, Sodium hypochlorite, Bacteriological peptone, Columbia agar, Suplemen selektif Preston, Horse blood steril, NaCl, BHI broth, dan

Tryptone Soy Agar. Selain itu juga diperlukan Vial eppendorf, Tabung reaksi bertutup ulir, Cawan petri, dan pipet dengan tips-nya.

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah refrigerator untuk penyimpanan bahan pangan yang dikontaminasi dengan *Campylobacter*, Anoxomat-System (type WS9000, MART®, Lichtenvoorde, The Netherlands) untuk membuat kondisi mikroaerofilik (6% O₂), inkubator suhu 42°C dan mikroskop flouresen untuk menganalisis viabilitas sel.

Metode

- Identifikasi keberadaan *Campylobacter jejuni* dalam bahan pangan

Sekitar 50 sampel daging ayam segar maupun sayur selada diambil dari pasar/swalayan di kota Bogor. Sebanyak 50 g sampel dimasukkan ke dalam plastik stomacher dan ditambah dengan larutan garam-pepton fisiologis (NaCl 8.5 g/l dan Neutralised Bacteriological Peptone 1 g/l). Selanjutnya sampel dihomogenisasi menggunakan Stomacher® (type 400 Circulator) pada 260 rpm selama 60 detik. Pengenceran sampel dilakukan dengan membuat suspensi pada larutan garam-pepton fisiologis sampai dengan 10⁻⁶.

Suspensi pengenceran sampel selanjutnya ditumbuhkan pada media agar selektif yaitu agar Columbia-Blood-Preston yang mengandung 5 % *lysed-defibrinated* darah hewan (kuda/kambing) dan Preston-Campylobacter supplement. Inkubasi dilakukan selama 40-48 jam pada suhu 42°C secara mikroaerofilik (6% O₂). Kondisi mikroaerofilik dibuat dengan menggunakan Anoxomat-System (type WS9000, MART®). Enumerasi jumlah koloni yang tumbuh dilakukan sesuai dengan metode standard. Untuk sel yang spesifik dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dan konfirmasi dilakukan identifikasi menggunakan API Campy.

- Pemaparan dengan larutan klorin

Kultur stok *Campylobacter jejuni* disimpan pada -40°C di dalam vial yang berisi Brain Heart Infusion (BHI) broth dengan gliserol 25% (vol/vol) dan manik-manik gelas (glass beads ø 2 mm). Kultur uji dipersiapkan dengan mengambil 3 manik-manik secara aseptis dan menumbuhkannya dalam 10 ml BHI broth dengan inkubasi selama 40-48 jam pada suhu 42°C secara mikroaerofilik (6% O₂). Suspensi kultur uji selanjutnya dibuat dengan melakukan pengenceran sel pada larutan garam-pepton fisiologis. Dua tingkat cemaran digunakan dalam percobaan yaitu: tingkat kontaminasi tinggi (sekitar 10⁷ koloni/ml) dan tingkat kontaminasi rendah (sekitar 10⁴ koloni/ml).

Kontaminasi pada produk dilakukan dengan merendam/melumuri 100 g bahan pangan dengan 100 ml suspensi kultur uji dengan masa kontak 30 menit, 50 menit dan 120 menit pada suhu refrigerator.

Larutan klorin dibuat dengan mengencerkan sodium hypochlorite sampai dengan 10 dan 100 ppm. Bahan pangan yang sudah dikontaminasi dengan *Campylobacter* dicelupkan ke dalam larutan klorin dengan masa kontak 1 dan 5 menit. Selanjutnya sampel dibilas dengan air dingin dan disimpan dalam refrigerator (suhu 4-7°C) selama 1 hari (15-18 jam).

Kulturabilitas sel (kemampuan untuk ditumbuhkan pada media cawan) diidentifikasi dengan menumbuhkan sel pada agar cawan Tryptone Soy Agar untuk media non-selektif dan agar Columbia-Blood-Preston sebagai media selektif. Inkubasi dilakukan selama 40-48 jam pada suhu 42°C secara mikroaerofilik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prevalensi *Campylobacter jejuni* dalam Bahan Pangan

Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa 30% dari contoh yang dianalisa diduga tercemar oleh *Campylobacter jejuni*. Analisis mikroskopi menunjukkan bahwa morfologi sel yang ditemukan adalah sel masa transisi yang mengalami perubahan dari bentuk spiral ke bentuk kokoid.

Berbagai studi telah dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan bertahan hidup *C. jejuni* pada berbagai kondisi. Pada permukaan stainless steel, *C. jejuni* dapat bertahan hidup sampai dengan 4 jam, dan meningkat ketahanannya jika terdapat residu suspensi/air daging ayam pada permukaan (Kusumaningrum et al, 2003b). *C. jejuni* dapat bertahan hidup selama beberapa minggu dalam air tanah, dan survival bakteri dapat diperpanjang dengan adanya material organik atau dalam biofilm (Buswell et al, 1998).

Pada studi lain, seperti yang telah disebutkan sebelumnya, *C. jejuni* dapat bertahan hidup pada daun tanaman yang disimpan pada suhu 10° C untuk beberapa minggu. Adanya kerusakan jaringan tanaman dan cemaran tanah dapat memperpanjang waktu survival (Brandl et al, 2004). *C. jejuni* juga dapat bertahan hidup pada suhu refrigerator (4° C) selama beberapa hari (Hazeleger, et al, 1998). Selanjutnya dalam studi lain ditemukan bahwa survival *C. jejuni* dalam HCl pada pH di bawah 3,0 adalah sangat rendah sedangkan pada pH di atas 3,6 survival *C. jejuni* tidak dipengaruhi oleh kondisi pH (McClure dan BlackBurn, 2003).

Pengaruh Klorin Terhadap Kulturabilitas Sel *Campylobacter jejuni*

Secara umum, hasil sementara penelitian ini menunjukkan bahwa sel *Campylobacter* yang telah terpapar dengan klorin 10 dan 100 ppm dengan masa kontak 5 menit ditemukan kulturabilitasnya menurun sampai dengan 70% dan 90 %.

Aktivitas biosidal klorin maupun sodium hypoklorit tergantung dari beberapa faktor, antara lain adalah konsentrasi, pH, suhu dan keberadaan material organik. Sedangkan kerentanan mikroba terhadap bahan kimia sangat bervariasi tergantung pada spesies mikroba dan senyawa antimikroba (Kusumaningrum et al, 2003a).

Klorin (Cl₂) adalah komponen halogen yang dalam air akan larut membentuk asam hypoklorat (HOCl) dan asam hidroklorat. HOCl disebut juga klorin bebas dan merupakan senyawa aktif utama klorin untuk desinfeksi air. Selain terbentuk pada reaksi klorin dalam air, asam hypoklorat juga dapat dibentuk jika kalsium atau natrium hypoklorit dicampur dengan air dan mengalami disosiasi. Asam hypoklorat sebagai bahan saniter dapat membunuh bakteri patogen karena bersifat oksidator dan dapat menembus dinding sel sehingga dapat merusak fungsi protein maupun enzim sel (Leyser and Johnson 1993). Pada pH yang tinggi asam hypoklorat akan terdisosiasi menjadi H⁺ dan OCl⁻ (ion hypoklorit), sedangkan pada pH yang rendah asam hypoklorit akan cenderung kembali berada dalam bentuk Cl₂. Ion hypoklorit juga mempunyai aktivitas sebagai desinfektan, tetapi lebih lemah dibandingkan dengan asam hypoklorat karena bermuatan negatif yang dapat menghambat penetrasi melalui dinding sel. Asam hypoklorat mempunyai aktivitas 100 kali lebih besar dari pada ion hypoklorit dalam membunuh mikroba.

Beberapa peneliti telah mengkaji mekanisme klorin dalam inaktivasi bakteri, meskipun masih diperlukan berbagai kajian lanjut. Klorin dapat mengubah permeabilitas membran sel *Escherichia coli*, yang berakibat keluarnya protein dan RNA dari sel. Pada konsentrasi klorin yang tinggi dapat berakibat lepasnya DNA dari sel (Lisle et al, 1998; Saby et al, 1999). LeChevallier et al (1988) mempelajari sifat invasif dari *chlorine-injured*

Yersinia enterocolitica. Dua faktor sangat berpengaruh dalam sifat invasif bakteri ini yaitu: (1) bakteri harus viabel dan harus aktif secara metabolik dan (2) mikroba harus mempunyai komponen permukaan sel tertentu yang dapat menginduksi invasi. Dalam studi ini klorin ditemukan dapat mempengaruhi karakteristik membran terluar sel bakteri sehingga mereduksi kapasitas sel untuk berikatan dengan sel inang. Oksidasi grup sulfhydryl atau substitusi klorin ke dalam sekuen asam amino protein dinding sel bakteri diduga sebagai penyebab menurunnya kapasitas penempelan pada sel inang. Dalam studi lain ditemukan bahwa reaksi antara klorin dengan enzim pada permukaan sel dapat mereduksi efisiensi metabolisme. *Chlorine-injured* sel mengalami kerusakan pada sistem transport-nya dan tidak dapat memindahkan glukosa dan asam amino melalui membran sel (Lisle et al, 1998).

Penghargaan

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada DIKTI yang memberikan dana penelitian melalui Hibah Kompetisi Penelitian Dasar 2006.

PUSTAKA

- Altekruse, S.F., J.S. Norman, I.F. Patricia, dan D.L. Swerdlow. 1999. *Campylobacter jejuni* - An Emerging Foodborne Pathogen, *Emerging Infectious Disease*, 5(1): 15-20.
- Bhaduri, S. dan B. Cottrell. 2004. Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on Ground Chicken and Chicken Skin during Frozen Storage. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7103-7109.
- Brandl, M., A.F. Haxo, A.H. Bates, dan R.E. Mandrell. 2004. Comparison Of Survival Of *Campylobacter Jejuni* In The Phyllosphere With That In The Rhizosphere Of Spinach And Radish Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:1182-1189.
- Buswell, C. M., Y. M. Herlihy, L. M. Lawrence, J. T. M. McGuiggan, P. D. Marsh, C. W. Keevil, dan S. A. Leach. 1998. Extended Survival and Persistence of *Campylobacter jejuni*. in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA Staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 733-741.
- Hazeleger, W.C., J. A. Wouters, F. M. Rombouts, dan T. Abce. 1998. Physiological Activity of *Campylobacter jejuni* Far below the Minimal Growth Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3917-3922.
- Kusumaningrum, H.D., E. van Asselt, R.R. Beumer dan M.H. Zwietering. 2004. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food Protection* 67:1892-1903.
- Kusumaningrum, H.D., R. Paltinaite, A.J. Koomen, W.C. Hazeleger, F.M. Rombouts dan R.R. Beumer. 2003a. Tolerance of *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach. *Journal of Food Protection* 66:2289-2295.

- Kusumaningrum, H.D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, dan R.R. Beumer. 2003b. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85:227-236.
- Leyer, G.J. dan E.A. Johnson. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1842-1847.
- LcChevallier, M.W., C.D. Cawthon, dan R.G. Lcc. 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:2492-2499.
- Lisle, J. t., S.C. Broadway, A.M. Prescott, B.H. Pyle, C. Fricker, dan G.A. McFeters. 1998. Effects of starvation on physiological activity and chlorine resistance in *Escherichia coli*)157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4658-4662.
- McClure P.J. dan C. de W. BlackBurn. 2003. *Camppylobacter and Arcobacter*. Dalam: Foodborne pathogens: Hazard, risk analysis and control. Editor: BlackBurn, C. de W dan P.J. McClure. CRC Press, Washington DC.
- Saby, S., P. Leroy dan J.C. Block. 1999. *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5600-5603.
- WHO. 2001. WHO Surveillance program for control of foodborne Infections and intoxications in Europe, Seventh Report 1993-1998. Berlin, Germany.