



## POLA PERTUMBUHAN *LISTERIA MONOCYTOGENES* SELAMA FERMENTASI TEMPE YANG DIPERKAYA *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

Suci Apsari Pebrianti, Lilis Nuraida dan Ratih Dewanti-Hariyadi

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University

Email: suci.apsari@gmail.com, lilis@seafast.org dan ratihde@apps.ipb.ac.id

### Abstract

*Salmonella Paratyphi B* outbreak showed the risk of other pathogenic microbial contamination in tempe including *Listeria monocytogenes* which is commonly found in insanitary condition. Moreover, tempe production in Indonesia still lack of sanitation. Lactic acid bacteria (LAB) like *Lactobacillus fermentum* could inhibit the growth of microbial pathogen. This study aims to determine the growth behavior of *Listeria monocytogenes* during fermentation of tempe enriched with *Lactobacillus fermentum*. The artificial contamination of *Listeria monocytogenes* at 3 log CFU/g and 5 log CFU/g was done in tempe with and without *Lactobacillus fermentum* (6 log CFU/g). The plate count method was used to calculate *Listeria monocytogenes*, LAB, and mold, and the visual observations were carried out at 0, 4, 24, 48, and 72 hours of fermentation. Results showed that *Listeria monocytogenes* contaminated at 3 log CFU/g during tempe fermentation was well inhibited by *Lactobacillus fermentum*. However, *Lactobacillus fermentum* was unable to inhibit *Listeria monocytogenes* contaminated at 5 log CFU/g and could grow up to 4.6 log CFU/g at the end of fermentation. The growth of mold during fermentation was not disrupted by *Listeria monocytogenes* and could produces good quality tempe that endangered consumers because the visual did not differ between contaminated and normal tempe.

**Keywords:** Tempe, fermentation, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus fermentum*.

### Abstrak

Ditemukannya mikroba patogen *Salmonella Paratyphi B* pada tempe menunjukkan potensi kontaminasi patogen lain selama pembuatan tempe, termasuk *Listeria monocytogenes* yang umum ditemukan di lingkungan bersanitasi buruk. Terlebih, penerapan sanitasi produksi tempe di Indonesia masih sangat rendah. Pertumbuhan mikroba patogen dapat dihambat oleh bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus fermentum*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perilaku pertumbuhan *Listeria monocytogenes* selama fermentasi tempe yang diperkaya *Lactobacillus fermentum*. Pada penelitian ini dilakukan kontaminasi buatan *Listeria monocytogenes* sebesar 3 log CFU/g dan 5 log CFU/g pada tempe dengan dan tanpa penambahan *Lactobacillus fermentum* (6 log CFU/g). Metode hitungan cawan digunakan untuk menghitung *Listeria monocytogenes*, BAL, dan kapang, serta dilakukan pengamatan visual tempe yang dilakukan pada jam ke-0, 4, 24, 48, dan 72 fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dengan kontaminasi awal 3 log CFU/g selama fermentasi tempe dapat dihambat dengan baik oleh *Lactobacillus fermentum*. Sebaliknya, penambahan *Lactobacillus fermentum* tidak mampu menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dengan kontaminasi awal 5 log CFU/g yang mampu tumbuh mencapai 4.6 log CFU/g di akhir fermentasi. Kontaminasi buatan *Listeria monocytogenes* tidak mengganggu pertumbuhan kapang selama fermentasi dan menghasilkan tempe berkualitas baik sehingga berpotensi membahayakan konsumen karena tidak terdapat perbedaan visual dengan tempe normal.

**Kata kunci:** Tempe, fermentasi, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus fermentum*.

## Pendahuluan

Tempe merupakan produk fermentasi kedelai menggunakan kapang *Rhizopus* sp. Beragam populasi mikroba seperti khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri non-patogen jenis lain juga dapat tumbuh selama fermentasi tempe (Nurdini, A. L., Nuraida, L., Suwanto, A., 2015) Kondisi pengolahan tempe terutama sanitasi dan higiene akan mempengaruhi populasi mikroba tempe. Sebagian besar industri tempe di Indonesia masih belum maksimal menerapkan prinsip *Good Manufacturing Practices* (GMP) sehingga berpotensi menghasilkan tempe dengan mutu keamanan pangan dari aspek mikrobiologi yang masih rendah (Suhartono et al., 2008). Penerapan sanitasi yang buruk selama pengolahan tempe akan meningkatkan risiko kontaminasi mikroba patogen pada tempe yang dapat membahayakan konsumen.

Di Indonesia, sampai saat ini tidak ada laporan resmi kasus keracunan akibat konsumsi tempe yang terkontaminasi mikroba patogen. Sementara itu, kasus keracunan tempe akibat kontaminasi mikroba patogen *Salmonella* paratyphi B dilaporkan terjadi di Amerika pada tahun 2012 (Griese, S E., Fleischauer, A T., MacFarquhar, J. K., Moore, Z., Harrelson, C., Valiani, A., Morrison, S E., Sweat, D., Maillard, J., Griffin, D., Springer, D., Mikoleit, M., Newton, A. E., Jackson, B., Nguyen, Thai-An, Bosch, S., & Davies, 2013) Kasus tersebut menunjukkan adanya potensi kontaminasi mikroba patogen selama pengolahan tempe terutama jika prinsip sanitasi tidak diterapkan dengan baik. Penelitian (Emilia, 2014) melaporkan bahwa *Bacillus subtilis* mampu tumbuh dan bertahan hidup selama fermentasi tempe dan menghasilkan tempe dengan kualitas visual yang tidak berbeda dengan tempe yang tidak terkontaminasi. Kondisi tersebut dapat membahayakan karena konsumen tidak dapat membedakan tempe yang baik dengan tempe yang sudah terkontaminasi mikroba patogen.

*Listeria monocytogenes* adalah bakteri patogen yang dapat tumbuh rentang suhu dan pH cukup luas, yaitu antara -1,5 sampai 50°C dan pH 4 sampai 9,6. Bakteri ini mampu membentuk biofilm di lingkungan dan permukaan peralatan produksi pangan

(Rodriguez-Lopez, P., Rodriguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., & Cabo, 2018). *Listeria monocytogenes* umum ditemukan di lingkungan pengolahan pangan seperti lantai, saluran air, ruang pencucian, penyimpanan pangan, dan peralatan produksi pangan (Dalmaso, M., & Jordan, 2013) Konsumsi pangan terkontaminasi *Listeria monocytogenes* dapat menyebabkan listeriosis dengan gejala listeriosis meliputi demam, muntah, diare dan dapat berkembang menjadi meningitis, bakteremia serta keguguran pada ibu hamil dan kematian bayi (Rodriguez-Lopez, P., Rodriguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., & Cabo, 2018)

Kontaminasi *Listeria monocytogenes* dilaporkan terjadi pada produk pangan fermentasi seperti keju (Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, 2017), kimchi (Ga-Young Cho, Min Hwa Lee, 2011) kefir (Gulmez & Guven, 2003), dan sosis (Meloni, 2015) *Listeria monocytogenes* juga dapat mengontaminasi tempe apabila selama pengolahan tempe tidak menerapkan kontrol mikrobiologi dan sanitasi yang baik. Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dilaporkan dapat dihambat oleh aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). *Lactobacillus fermentum* merupakan salah satu BAL yang tumbuh dominan selama fermentasi tempe (Sulistiani & Hidayat, 2020) dan dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen seperti *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, dan *Staphylococcus aureus* (Panjaitan et al., 2018).

Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* pada produk tempe asal Malaysia dilaporkan dapat dihambat dengan baik oleh BAL, *Enterococcus faecium* yang menghasilkan bakteriosin (Moreno et al., 2002). Pada penelitian ini, BAL yang ditambahkan adalah *Lactobacillus fermentum* yang diprediksi akan mampu menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* selama fermentasi tempe. *Lactobacillus fermentum* memproduksi beragam senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, asam asetat, dan asam laktat (Panjaitan, R., Nuraida, L., dan Dewanti-Hariyadi, 2018)

yang bisa mengganggu pertumbuhan mikroba patogen sehingga bisa mencegah kerusakan mutu dan keamanan tempe yang dihasilkan.

Berdasarkan pemaparan di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji potensi kontaminasi mikroba patogen lain, yaitu *Listeria monocytogenes* dan mengetahui pola pertumbuhan *Listeria monocytogenes* selama fermentasi tempe dengan adanya penambahan BAL, *Lactobacillus fermentum*. Penambahan BAL di awal fermentasi tempe pada penelitian ini diharapkan mampu menekan pertumbuhan *Listeria monocytogenes* sehingga di akhir fermentasi dapat dihasilkan tempe dengan mutu mikrobiologis yang aman dari bahaya kontaminasi mikroba patogen.

### Metode Penelitian

Pengolahan tempe menggunakan kedelai yang diperoleh dari industri tempe Sindang Barang, Bogor, Indonesia. Starter tempe yang digunakan adalah RAPRIMA® (PT. Aneka Fermentasi Indonesia, Bandung, Indonesia), kultur *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, kultur *Lactobacillus fermentum* S21209 yang diperoleh dari Laboratorium SEAFast Center IPB. Media agar yang digunakan berasal dari Oxoid (UK), yaitu *Palcam base agar* CM0877, *Palcam selective supplement* SR0150, *Potato Dextrose Agar* (PDA) CM0139, *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) CM0361, *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) CM0359, dan *Brain Heart Infusion* (BHI) CM1135. Bahan kimia yang digunakan berasal dari Merck (Germany), yaitu adalah kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ), natrium azida ( $\text{NaN}_3$ ), dan asam tartarat ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ).

#### 1. Persiapan Inokulum

Inokulum yang disiapkan adalah kultur *Listeria monocytogenes* dan *Lactobacillus fermentum*. Kultur *Listeria monocytogenes* yang telah ditumbuhkan pada media agar *Palcam* diambil sebanyak satu ose kemudian dipindahkan ke dalam 10 mL BHI dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Selanjutnya, kultur diencerkan ke dalam 9 mL larutan  $\text{NaCl}$  0.85% steril sesuai tingkat pengenceran yang dibutuhkan (Spanu, C.,

Christian, S., Michela, I., Carlo, P., Vincenzo, S., Enrico, 2014).

Sebanyak satu ose kultur *Lactobacillus fermentum* diambil dari agar tusuk MRSA kemudian dipindahkan ke dalam 10 mL MRSB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur kemudian disentrifuse selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 4°C. Selanjutnya, supernatan yang diperoleh dibuang dan diganti dengan larutan pengencer 10 mL larutan  $\text{NaCl}$  0.85% steril sesuai tingkat pengenceran yang dibutuhkan (Mathipa, G. M., & Thantsha, 2015)

#### 2. Pembuatan Tempe

Kedelai yang digunakan pada penelitian ini telah melalui proses perebusan, perendaman, dan pengupasan kulit ari yang diperoleh dari industri tempe Sindang Barang, Bogor. Kedelai yang telah diperoleh kemudian dilakukan pencucian dan perendaman menggunakan air panas selama 10 menit, pembilasan dengan air panas dan dilanjutkan dengan penirisan kedelai. Pembuatan tempe terdiri tempe normal, yaitu tempe yang hanya diinokulasi oleh kultur starter RAPRIMA®, tempe yang diinokulasi oleh kultur *Listeria monocytogenes* sebesar 3 log CFU/g dan 5 log CFU/g, dan tempe yang diinokulasi oleh *Listeria monocytogenes* (3 log CFU/g dan 5 log CFU/g) dan *Lactobacillus fermentum* sebesar 6 log CFU/g.

Inokulasi kultur *Listeria monocytogenes* dan *Lactobacillus fermentum* dilakukan pada perbandingan 1% (v/w) berat kedelai setelah penirisan. Kedelai yang telah diinokulasi kultur mikroba kemudian dilakukan pengadukan dan dilanjutkan dengan inokulasi kultur starter tempe RAPRIMA® yang ditambahkan pada perbandingan 0,05% (v/w) berat kedelai setelah penirisan. Selanjutnya, sebanyak 180 g kedelai dikemas menggunakan plastik yang telah dilubangi sebelumnya dan difermentasi di ruangan terbuka pada suhu  $\pm 31^\circ\text{C}$  selama 72 jam.

#### 3. Persiapan Sampel

Sampel diambil selama fermentasi berlangsung, yaitu pada jam ke-0, 24, 48,

dan 72. Sebanyak 25 g sampel diencerkan ke dalam 225 mL larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  steril kemudian dihancurkan menggunakan *stomacher* selama 2 menit. Selanjutnya, diambil 1 mL larutan kemudian diencerkan kembali dalam 9 mL larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  steril sampai tingkat pengenceran yang diinginkan.

4. Analisis *Listeria monocytogenes*

Perhitungan *Listeria monocytogenes* dilakukan dengan teknik cawan tuang menggunakan media agar *Palcam* yang telah ditambahkan *Palcam selective supplement* (1 mL dalam 250 mL agar *Palcam*). Sebanyak 0,1 mL sampel dari pengenceran yang sesuai dimasukkan ke dalam cawan berisi media agar *Palcam* kemudian diinkubasi secara terbalik pada suhu 35°C selama 48 jam. Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dicirikan dengan koloni berwarna hijau keabu-abuan yang dikelilingi area hitam (Manual, 2017) Perhitungan total *Listeria monocytogenes* dilakukan berdasarkan *Standar Plate Count*, yaitu cawan dengan jumlah koloni 25-250 yang dilaporkan dalam *Colony Forming Unit* (CFU) per gram.

5. Analisis BAL

Perhitungan BAL dilakukan dengan teknik cawan sebar menggunakan media agar MRSA yang ditambahkan natrium azida 0,2% (1 mL ke dalam 250 mL MRSA). Sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam cawan dilanjutkan dengan penuangan agar MRSA. Inkubasi cawan dilakukan secara terbalik pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan BAL dicirikan dengan koloni berwarna putih (BAM, 2001<sup>a</sup>). Perhitungan total bakteri asam laktat berdasarkan *Standar Plate Count*, yaitu cawan dengan jumlah koloni 25-250. Jumlah koloni dalam sampel dilaporkan dalam *Colony Forming Unit* (CFU) per gram.

6. Analisis Kapang

Perhitungan total kapang dilakukan dengan teknik cawan sebar menggunakan media agar PDA yang ditambahkan asam tartarat 10% (2,5 mL ke dalam 250 mL PDA). Sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam cawan dilanjutkan

dengan penuangan agar PDA. Cawan kemudian diinkubasi terbalik pada suhu 30°C selama 5 hari (BAM, 2001<sup>b</sup>). Perhitungan total kapang berdasarkan *Standar Plate Count*, yaitu cawan dengan jumlah koloni 10-150. Jumlah koloni dalam sampel dilaporkan dalam *Colony Forming Unit* (CFU) per gram.

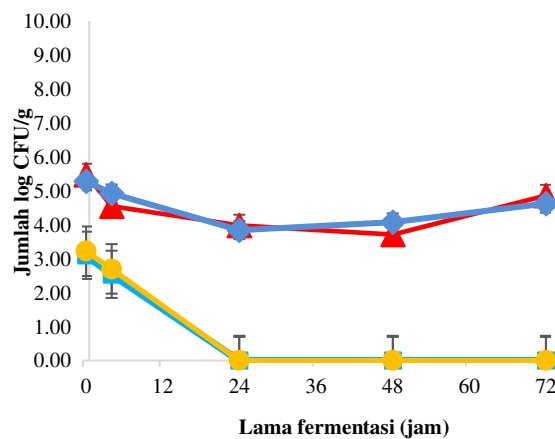
7. Analisis statistik

Data hasil penelitian diolah menggunakan *SPSS Statistic 20.0*. Data pertumbuhan mikroba selama fermentasi tempe dibandingkan menggunakan uji ANOVA dan uji lanjut Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil dan Pembahasan

1. Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* selama fermentasi tempe

*Listeria monocytogenes* diinokulasikan pada kedelai dengan tingkat kontaminasi yang berbeda, yaitu tingkat kontaminasi tinggi sebesar 5 log CFU/g dan rendah sebesar 3 log CFU/g. Hasil penelitian pada Gambar 1 menunjukkan bahwa *Listeria monocytogenes* memiliki pola pertumbuhan yang sama selama fermentasi tempe normal maupun tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum*. Tingkat kontaminasi *Listeria monocytogenes* yang tinggi (5 log CFU/g) mampu tumbuh dan bertahan hidup selama fermentasi tempe, baik tempe normal ataupun tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum*. Sementara itu, pertumbuhan *Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan pada tingkat kontaminasi rendah (3 log CFU/g) dapat dihambat oleh keberadaan BAL alami maupun penambahan *Lactobacillus fermentum*.



**Gambar 1** Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* selama fermentasi tempe normal (▲ 5 log CFU/g, ■ 3 log CFU/g) dan tempe yang diperkaya *Lactobacillus fermentum* (◆ 5 log CFU/g, ● 3 log CFU/g).

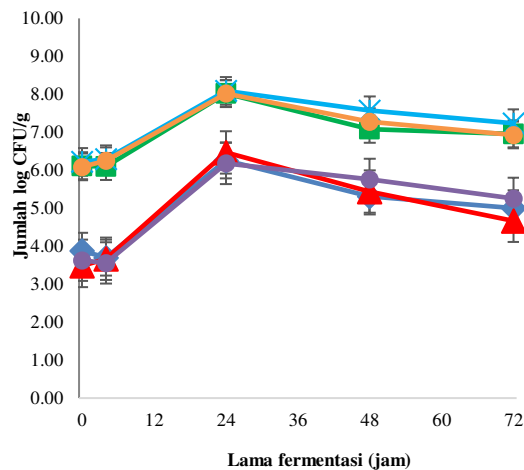
*Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan sebesar 3 log CFU/g tidak dapat tumbuh selama fermentasi pada tempe normal maupun tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum* dengan jumlah <1 log CFU/g di akhir fermentasi. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL alami dan *Lactobacillus fermentum* yang ditambahkan di awal fermentasi tempe diduga cukup efektif menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* yang ditambahkan pada tingkat konsentrasi rendah. *Lactobacillus fermentum* dilaporkan menghasilkan bakteriosin, hidrogen peroksida, asam asetat, dan asam laktat (Panjaitan et al., 2018). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Ashenafi (1991) yang juga melaporkan bahwa pertumbuhan *Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan sebesar 2,5 log CFU/g pada tempe dapat dihambat dengan penambahan BAL, *Lactobacillus plantarum* sebesar 6,5 log CFU/g di awal fermentasi.

*Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan sebesar 5 log CFU/g mampu tumbuh mencapai 4,8 log CFU/g di akhir fermentasi tempe normal dan 4,6

log CFU/g di akhir fermentasi tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum*. Batas kontaminasi *Listeria* sp. yang diatur oleh Codex (2007) adalah negatif per 25 g sampel (kurang dari 0,04 CFU/g). Jumlah *Listeria monocytogenes* pada tempe siap konsumsi (fermentasi 48 jam) adalah sebesar 3,8 log CFU/g dan sudah melebihi batas maksimum kontaminasi *Listeria monocytogenes* sehingga tempe menjadi tidak aman untuk dikonsumsi. Konsumsi tempe di Indonesia umumnya dilakukan setelah melalui tahap pemasakan sehingga menurunkan potensi keracunan pangan. *Listeria monocytogenes* dilaporkan dapat dihilangkan dengan pemanasan pada suhu diatas 63°C selama 30 menit (Robert et al., 2020).

## 2. Pertumbuhan BAL selama fermentasi tempe

Penambahan *Lactobacillus fermentum* sebesar 6 log CFU/g kedelai dilakukan di awal fermentasi. Gambar 2 menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL memiliki pola yang pada semua perlakuan tempe. Jumlah BAL di awal fermentasi pada tempe normal adalah sebesar 3,8 log CFU/g dan meningkat mencapai 6,3 log CFU/g pada fermentasi jam ke-24. Sementara itu, jumlah BAL pada tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum* mengalami peningkatan yang lebih lambat, yaitu dari 6,1 log CFU/g di awal fermentasi menjadi 8 log CFU/g pada fermentasi jam ke-24. Di akhir fermentasi, jumlah BAL mencapai 5 log CFU/g pada tempe normal dan 7 log CFU/g pada tempe dengan penambahan *Lactobacillus fermentum*.



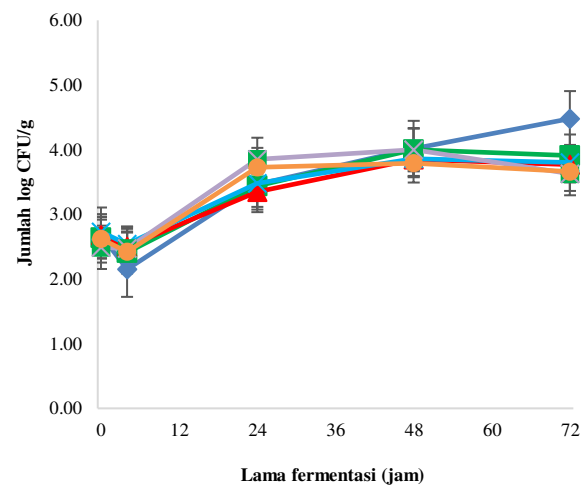
**Gambar 2** Pertumbuhan BAL selama fermentasi tempe normal (♦), tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* (■), tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* (▲ 5 log CFU/g, ● 3 log CFU/g), dan tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* dan *Listeria monocytogenes* (× 5 log CFU/g, ● 3 log CFU/g).

Jumlah BAL di akhir fermentasi tempe berkisar antara 6-8 log CFU/g (Efriwati et al., 2013; Nurdini et al., 2015). BAL dikategorikan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS), yaitu mikroorganisme yang tidak berisiko terhadap kesehatan bahkan mampu meningkatkan mutu pangan dengan aktivitas antimikroba dapat menekan pertumbuhan mikroba patogen (Urnemi et al. 2011).

### 3. Pertumbuhan Kapang Selama Fermentasi Tempe

Kultur starter RAPRIMA mengandung spora *Rhizopus oligosporus* yang merupakan kapang dominan yang tumbuh pada tempe (Purwijatiningsih et al. 2005). Kapang tumbuh dengan baik pada semua perlakuan tempe dengan pola pertumbuhan yang sama kecuali pada tempe normal (Gambar 3). Pertumbuhan kapang pada tempe normal terus meningkat mencapai 4,5 log CFU/g d

akhir fermentasi sedangkan pada perlakuan tempe lain, pertumbuhan kapang mengalami penurunan. Adanya kompetisi antar mikroba yang tumbuh pada tempe diduga menjadi penyebab terjadinya penurunan pertumbuhan kapang. Selain itu, aktivitas antifungal yang dihasilkan oleh BAL juga diduga mempengaruhi pertumbuhan kapang (Oranusi et al., 2013).



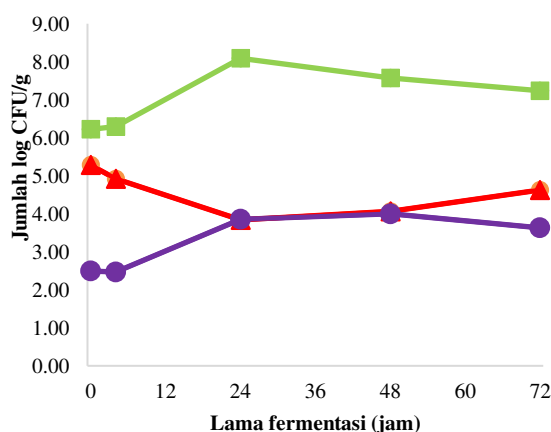
**Gambar 3** Pertumbuhan kapang selama fermentasi tempe normal (♦), tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* (■), tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* (▲ 5 log CFU/g, × 3 log CFU/g), dan tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* dan *Listeria monocytogenes* (× 5 log CFU/g, ● 3 log CFU/g).

Kapang dapat tumbuh mencapai 6,7 log CFU/g pada fermentasi tempe jam ke-72 (Nurdini et al. 2015). Hasil penelitian menunjukkan jumlah kapang pada fermentasi jam ke-72 adalah sebesar 4,5 log CFU/g (tempe normal) dan sekitar 3,7 log CFU/g pada tempe dengan perlakuan. Perbedaan jumlah kapang tidak berpengaruh pada penampakan visual tempe yang dihasilkan, yaitu diselimuti miselium berwarna putih pada permukaan dan bagian dalam tempe yang

menandakan adanya pertumbuhan kapang.

#### 4. Hubungan Pertumbuhan Kapang, BAL, dan *Listeria monocytogenes*

Gambar 5 menunjukkan grafik pertumbuhan *Listeria monocytogenes*, BAL, dan kapang selama fermentasi tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* (5 log CFU/g) dan *Lactobacillus fermentum* sebesar 6 log CFU/g. Pola pertumbuhan *Listeria monocytogenes* mengalami penghambatan dari awal fermentasi hingga fermentasi jam ke-48 kemudian mengalami peningkatan pada fermentasi jam ke-72. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Finazzi *et al.* (2011) yang melaporkan bahwa pertumbuhan *Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan sebesar 4 log CFU/ml pada produk fermentasi keju mozzarella juga mengalami penurunan di awal kemudian meningkat setelah 72 jam masa fermentasi. *Listeria monocytogenes* diduga memiliki fase lag atau fase adaptasi yang cukup lama akibat adanya kompetisi penggunaan substrat untuk pertumbuhan BAL.



**Gambar 4** Pertumbuhan *Listeria monocytogenes* (▲), BAL (■), dan kapang (●) pada tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes*

sebesar 5 log CFU/g dan *Lactobacillus fermentum*.

Pola pertumbuhan *Listeria monocytogenes* mengalami penurunan ketika pertumbuhan BAL dan kapang sedang mengalami peningkatan, yaitu pada fermentasi jam ke-0 sampai jam ke-24 untuk BAL dan fermentasi jam ke-0 sampai jam ke-48 untuk kapang. Sebaliknya, pola pertumbuhan *Listeria monocytogenes* mengalami peningkatan ketika pertumbuhan BAL dan kapang sudah mengalami penurunan, yaitu pada fermentasi jam ke-24 sampai jam ke-72 untuk BAL dan fermentasi jam ke-48 sampai jam ke-72 untuk kapang. Hal tersebut diduga berkaitan dengan adanya kompetisi antar mikroba, produksi senyawa dan metabolit oleh BAL dan kapang yang bersifat antimikroba (Oranusi *et al.*, 2013).

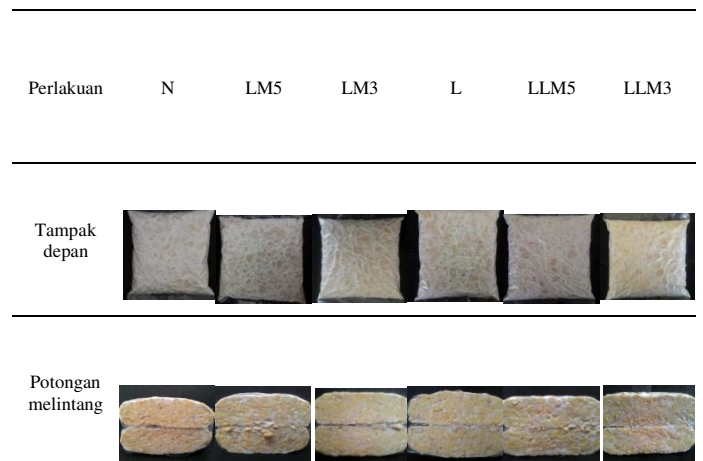
*Listeria monocytogenes* diketahui hanya bisa memanfaatkan substrat karbohidrat sederhana sebagai sumber karbon, seperti glukosa, manosa, selobiosa, dan gliserol (Schneebeli & Egli, 2013). Bakteri ini juga memerlukan asam amino seperti sistein, valin, isoleusin, leusin, fenilalanin, dan triptofan untuk dapat menunjang pertumbuhan (Siddiqi & Khan, 1989). Selama fermentasi tempe terjadi pemecahan karbohidrat, protein, lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana (Nout & Kiers, 2005) yang baru bisa dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan *Listeria monocytogenes*. Oleh karena itu, pertumbuhan *Listeria monocytogenes* (5 log CFU/g) baru mulai mengalami peningkatan setelah memasuki masa akhir fermentasi seiring dengan tersedianya substrat hasil pemecahan oleh enzim dari kapang dan BAL.

Tempe yang diperkaya dengan *Lactobacillus fermentum* sebesar 6 log CFU/g di awal fermentasi memiliki

jumlah BAL yang lebih tinggi (7 log CFU/g) dibandingkan dengan tempe normal (5 log CFU/g). Akan tetapi, jumlah BAL yang lebih tinggi pada tempe yang diperkaya *Lactobacillus fermentum* ternyata tidak mampu mengendalikan pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dengan tingkat kontaminasi tinggi (5 log CFU/g). Hal ini diduga berkaitan dengan tingkat kontaminasi *Listeria monocytogenes* yang tinggi di awal fermentasi, produksi senyawa antimikroba yang tidak memadai, dan ketersediaan substrat serta suhu fermentasi yang mendukung pertumbuhan *Listeria monocytogenes* (Iulietto et al., 2018).

## 5. Pengamatan Visual Tempe

Penampakan visual tempe pada semua perlakuan adalah sama, yaitu dicirikan dengan pertumbuhan miselium kapang berwarna putih, tekstur kompak, serta aroma khas tempe. Hal tersebut menunjukkan bahwa kontaminasi *Listeria monocytogenes* tidak mengganggu pertumbuhan kapang sehingga tetap bisa menghasilkan tempe dengan karakteristik fisik yang baik, tidak terbentuk aroma busuk, dan secara visual tidak berbeda dengan tempe normal. Kondisi ini berpotensi dapat membahayakan konsumen karena tempe yang telah terkontaminasi *Listeria monocytogenes* memiliki penampakan yang sama dengan tempe normal sehingga konsumen tidak bisa membedakan antara tempe normal dengan tempe yang sudah terkontaminasi *Listeria monocytogenes*.



Keterangan:

- N : Tempe normal
- LM5 : Tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* sebesar 5 log CFU/g
- LM3 : Tempe yang diinokulasi *Listeria monocytogenes* sebesar 3 log CFU/g
- L : Tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum*
- LLM5 : Tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* + *Listeria monocytogenes* 5 log CFU/g
- LLM3 : Tempe yang diinokulasi *Lactobacillus fermentum* + *Listeria monocytogenes* 3 log CFU/g

## Kesimpulan

*Listeria monocytogenes* yang diinokulasikan pada tingkat kontaminasi rendah (3 log CFU/g) tidak mampu tumbuh selama fermentasi tempe sedangkan pada atingkat kontaminasi tinggi (5 log CFU/g), *Listeria monocytogenes* mampu tumbuh dan bertahan hidup mencapai 4,8 log CFU/g pada tempe normal dan 4,6 log CFU/g pada tempe yang diperkaya *Lactobacillus fermentum*. Kontaminasi *Listeria monocytogenes* tidak menghasilkan produk tempe dengan kondisi visual yang sama dengan tempe normal sehingga berpotensi membahayakan konsumen. Penambahan BAL, *Lactobacillus fermentum* sebesar 6 log CFU/g di awal fermentasi tidak cukup efektif untuk menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* pada tingkat kontaminasi tinggi. Pencegahan dan penanganan kontaminasi *Listeria monocytogenes* pada tempe dapat dilakukan dengan penerapan sanitasi dan pengolahan tempe yang tepat sebelum dikonsumsi.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas dukungan finansial yang diberikan melalui program Dana Hibah Kompetensi Tahun 2015 atas nama Prof. Dr. Lilis Nuraida, M.Sc.

### Bibliografi

- Ashenafi, M. (1991). Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, 8, 303–310.
- BAM Bacteriological Analytical Manual. (2001<sup>a</sup>). BAM Chapter 3: Aerobic plate count [internet]. Tersedia dari <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>.
- BAM Bacteriological Analytical Manual. (2011<sup>b</sup>). BAM Chapter 18: Yeasts, molds, and mycotoxins [internet]. Tersedia dari: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
- BAM Bacteriological Analytical Manual. (2017). BAM Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. [Internet]. Tersedia dari <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75(1-13).
- Codex (2007) Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene on the Control of *Listeria monocytogenes* in Foods (CAC/GL 61 - 2007). Codex Alimentarius Commission, Geneva, Switzerland. [Internet]. Tersedia dari <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>
- Dalmasso, M, & Jordan, K.( 2013). Process environment sampling can help to reduce the occurrence of *Listeria monocytogenes* in food processing facilities. *Iris Journal of Agricultural and Food Research*, 52(1), 93-100.
- Efriwati, Suwanto, A., Rahayu, G., & Nuraida, L. (2013). Population dynamics of yeasts and lactic acid bacteria (LAB) during tempeh production. *Hayati Journal of Bioscience*, 20(2). 57-64.
- Emilia, Q. (2014). Perilaku *Bacillus cereus* Selama Fermentasi Tempe yang Diperkaya Bakteri Asam Laktat. Skripsi. IPB University.
- Finazzi G, Daminelli P, Serraino A, Pisaamiglio V, Riu R, Giacometti F, Bertasi B, Losio MN, Boni P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 53(3), 364-370.
- Ga-Young Cho, Min Hwa Lee, & Changsun Choi. (2011). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during kimchi fermentation supplemented with raw pork meat. *Food Control*, 22(8), 1253-1260.
- Griese, S E., Fleischauer, A T., MacFarquhar, J. K., Moore, Z., Harrelson, C., Valiani, A., Morrison, S E., Sweat, D., Maillard, J., Griffin, D., Springer, D., Mikoleit, M.,

- Newton, A. E., Jackson, B., Nguyen, Thai-An, Bosch, S., & Davies, M. (2013). Gastroenteritis outbreak associated with unpasteurized tempeh, North Carolina, USA. *Emerging Infectious Disease*, 19(9), 1514-1517.
- Gulmez, M., & Guven, A. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in ayran and modified kefir as pre- and post fermentation contaminant. *Vetrinari Medicina*, 48(5):126-132.
- Iulietto, M. F., Sechi, P., Cella, E., Grisoldi, L., Ceccarelli, M., Ani, A. R., A., Isiklar, B., Anil, H. M., & Cenci-Goga, B. T. (2018). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a formulation of selected dairy starter cultures and probiotics in an *in vitro* model. *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 835-850.
- Mathipa, G. M., & Thantsha, M. S. (2015). Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Gut Pathogens*, 7(1), 1-14.
- Meloni, D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in mediterranean-style dry fermented sausages. *Foods*, 4(1), 34-50.
- Moreno, M. R. F., Leisner, J. J., Tee, L. K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 14-157.
- Nout, M. J. R., & Kiers, J. L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789-805.
- Nurdini, A. L., Nuraida, L., Suwanto, A., & Suliantari. (2015). Microbial growth dynamics during tempe fermentation in two different home industries. *International Food Research Journal*, 22(4), 1668-1674.
- Oranusi, S., Braide, W., & Ogouma, O. I. (2013). Antifungal properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Ricinus communis*, *Pentaclethra macrophylla* and yoghurts. *Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 001-006.
- Robert, B. N., Chakravarty, D., III Gardner, J. C., Ricke, S. C., & Donaldson, J. R. (2020). *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. *Pathogens*, 9(210), 1-9.
- Panjaitan, R., Nuraida, L., dan Dewanti-Hariyadi, R. (2018). Seleksi Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Tempe dan Tape Sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian*, 29(2), 175-184.
- Purwijatiningsih, E., Dewanti-Hariyadi, R., Nurwitri, C. C., & Istiana. (2005). Penghambatan Produksi Aflatoksin dari *Aspegillus flavus* oleh Kapang dan Khamir yang Diisolasi dari Ragi Tempe. *Biota*, 10(3), 146-153.
- Rodriguez-Lopez, P., Rodriguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., & Cabo, M. L. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7, 1-19.
- Schneebeli, R., & Egli, T. (2013). A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp. *Applied*

- Environmental Microbiology*, 79, 2503–2511.
- Siddiqi, R., & Khan, M. A. (1989). Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 261(2), 146-152.
- Spanu, C., Christian, S., Michela, I., Carlo, P., Vincenzo, S., Enrico, P. L. D. S. (2014). Microbiological challenge testing for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food: a practical approach. *Italian Journal of Food Safety*, 3(4), 231-237.
- Suhartono., Sulaeman, A., & Setiawan, B. (2008). Penerapan Prinsip-prinsip Mutu dan Keamanan Pangan Tempe di Kabupaten Lampung Barat. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 3(3), 244-249.
- Sulistiani & Hidayat, I. (2020). Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dari Tempe dan Tape Berdasarkan Sekuen Fen 16s rRNA. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera*, 37(2), 67-77.
- Urnemi, Sumaryati, S., Endang, P., Sanusi, I., & Jamsari. (2011). Potensi bakteri asam laktat dalam menghasilkan bakteriosin sebagai antimikroba dan pengukuran berat molekulnya dengan SDS-Page dari isolat fermentasi kakao. *J Ris Kim*. 4(2): 94-100.