

PENAPISAN BAKTERIOSIN DARI BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL BEKASAM

SCREENING FOR BACTERIOCIN OF LACTIC ACID BACTERIA FROM BEKASAM

Desniar^{1*}, Iman Rusmana², Antonius Suwanto², Nisa Rachmania Mubarik²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

*Korespondensi: Jl. Agathis 1, Darmaga-Bogor, Indonesia 16680 E-mail : desniar2004@yahoo.com

Abstract

Bacteriocin is proteinaceous compound that has bactericidal action against other microorganisms. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) is generally considered safe for human consumption and can be applied in food preservation. One source of indigenous LAB is from Indonesian fermented fish products, bekasam. This study aimed to obtain LAB isolates from bekasam that have high potential as producer of bacteriocin. The steps were screening of bacteriocin compound and protein precipitation using ammonium sulfate with a concentration of 0-10% to 70-80%. Screening of bacteriocin compounds of 25 isolates LAB from bekasam showed that there were 11 isolates (44%) that have the potential as producer of bacteriocin, in which the cell-free supernatant to pH 5 and or pH 6 produce inhibitory zones on the indicator bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Then, the precipitation of proteins from the cell-free supernatant was done for the selected four isolates that have the potential as producer of bacteriocin. The supernatant and the precipitate from yield of protein precipitation in the selected four isolates showed that inhibition zone against the indicator bacteria *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14 028, and *L. monocytogenes* with inhibition zone around 3.0 to 10.0 mm. Inhibition zones in the supernatant and the precipitate were indication that active compound is organic acid and bacteriocin, respectively. The highest inhibition zone of the supernatant and the precipitate of the BP(3) and SK(5) isolates against *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*, respectively. The highest inhibition zone of the supernatant of the BP(20) and BI(3) isolates against *S. typhimurium* and *S. typhimurium* and *E. coli*, respectively. While the highest inhibition zone of precipitate of the BP(20) and BI(3) isolates were same, that is against *E. coli*. Each with ammonium sulfate concentrations were different.

Key words: Bacteriocin, lactic acid bacteria, bekasam

Abstrak

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memiliki efek bakterisida terhadap mikroorganisme lain. Bakteriosin dari bakteri asam laktat (BAL) secara umum dianggap aman untuk konsumsi manusia dan dapat diaplikasikan dalam pengawetan makanan. Salah satu sumber BAL indigenous adalah dari produk fermentasi ikan Indonesia, bekasam. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat BAL asal bekasam yang berpotensi tinggi sebagai penghasil bakteriosin. Tahapan yang dilakukan adalah penapisan senyawa bakteriosin dan pengendapan protein menggunakan amonium sulfat dengan konsentrasi 0-10% sampai 70-80%. Penapisan senyawa bakteriosin dari 25 isolat BAL asal bekasam menunjukkan bahwa ada 11 isolat (44%) yang berpotensi sebagai penghasil bakteriosin, dimana supernatan bebas sel dengan pH 5 dan atau pH 6 menghasilkan zona hambat pada bakteri indikator *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes*. Kemudian dilakukan pengendapan protein terhadap supernatan bebas sel dari empat isolat terpilih. Supernatan dan endapan dari hasil pengendapan protein pada keempat isolat terpilih menunjukkan zona hambat terhadap bakteri indikator *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14028, dan *L. monocytogenes* dengan zona hambat sekitar 3,0-10,0 mm. Zona hambat pada supernatan dan endapan mengindikasikan bahwa senyawa aktifnya masing-masing ialah asam organik dan bakteriosin. Zona hambat tertinggi dari supernatan dan endapan pada isolat BP(3) dan SK(5) masing-masing terhadap *L. monocytogenes* dan *S. typhimurium*. Zona hambat tertinggi dari supernatan pada isolat BP(20) dan BI(3) masing-masing terhadap *S. typhimurium* dan *S. typhimurium* dan *E. coli*. Sedangkan zona hambat tertinggi dari endapan pada isolat BP(20) dan BI(3) sama, yaitu terhadap *E. coli*. Masing-masing dengan konsentrasi amonium sulfat yang berbeda.

Kata kunci : bakteriosin, bakteri asam laktat, bekasam

PENDAHULUAN

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memiliki efek bakterisida terhadap mikroorganisme lain. Bakteriosin dari BAL atau BAL yang menghasilkan bakteriosin secara umum dianggap aman untuk konsumsi manusia dan dapat diaplikasikan dalam pengawetan makanan. Penggunaan bakteriosin dalam industri makanan dapat membantu untuk mengurangi penambahan pengawet kimia sama seperti mengurangi intensitas perlakuan panas, dan pada akhirnya akan menghasilkan makanan yang lebih awet secara alami dan lebih kaya akan sifat-sifat organoleptik dan nutrisinya. Keawetan ini disebabkan BAL berkontribusi dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen. Hambatan ini karena BAL dapat memproduksi beberapa metabolit seperti asam organik (asam laktat dan asetat), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin (Gálvez *et al.* 2007).

Bakteriosin secara komersial telah digunakan sebagai biopreservatif di beberapa Negara dan telah diaplikasikan pada beberapa makanan. Beberapa galur BAL menghasilkan bakteriosin yang mempunyai aktivitas bakterisidal terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (Tahara *et al.* 1996). Keuntungan penggunaan bakteriosin sebagai biopreservatif adalah: (1) tidak toksik dan mudah didegradasi oleh enzim proteolitik, karena bakteriosin adalah senyawa protein; (2) tidak berbahaya terhadap mikroflora usus karena bakteriosin mudah dicerna oleh enzim pencernaan; (3) mengurangi penggunaan preservatif kimia yang tidak aman; (4) penggunaannya mudah disesuaikan; dan (5) stabil dengan range pH dan suhu yang luas, karena bakteriosin toleran terhadap proses pengolahan yang menggunakan asam dan basa sama seperti juga toleran terhadap panas dan dingin (Cleveland *et al.* 2001).

Bekasam merupakan produk fermentasi ikan Indonesia yang rasanya asam, banyak dikenal di daerah Jawa Tengah, Sumatera Selatan dan Kalimantan Selatan. Proses pembuatan bekasam umumnya masih menggunakan proses fermentasi secara spontan dengan bahan baku ikan air tawar, garam dan sumber karbohidrat seperti nasi atau

tape dengan lama fermentasi sekitar 4-10 hari. Bekasam banyak mengandung BAL.

Menurut Ostergaard *et al.* (1998) BAL merupakan mikroorganisme dominan yang ditemukan dalam produk fermentasi ikan, termasuk plaa-som (produk sejenis bekasam dari Thailand). Seperti yang dilaporkan oleh Paludan-Muller *et al.* (2002) bahwa telah diisolasi BAL dari produk fermentasi ikan plaa-som, yaitu *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus alimentarius/farciminis*, *Weissella confusa*, *L. plantarum* dan *Lactococcus garviae*. Tanasupawat *et al.* (1998) juga melaporkan bahwa ada 47 galur BAL homofermentatif berbentuk batang dan 5 heterofermentatif bentuk bola yang diisolasi dari 4 jenis fermentasi ikan (pla-ra, pla-chom, kung-chom dan hoi-dong). Kopermsub *et al.* (2006) juga mengisolasi bakteri asam laktat dari produk plaa-som, yaitu *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Cornobacterium* spp. dan *Enterococcus* spp.

Beberapa bakteri yang diisolasi dari produk fermentasi ikan ini menghasilkan bakteriosin bahkan di antaranya termasuk jenis baru. Misalnya, *Weissella cibaria* 110, yang diisolasi dari produk fermentasi ikan Thai plaa-som ditemukan menghasilkan bakteriosin yang aktif terhadap bakteri Gram positif. Karena bakteriosin ini tidak ada kesamaan dengan bakteriosin lain yang sudah diketahui, maka bakteriosin ini didefinisikan sebagai bakteriosin baru, yaitu weissellicin 110 (Sriounnual *et al.* 2007). *Staphylococcus homini* KQU-131, yang diisolasi dari produk fermentasi ikan laut Thai (pla-ra), menghasilkan suatu bakteriosin yang stabil terhadap panas. Bakteriosin ini merupakan varian nukasin ISK-1, tipe II(A) lantibiotik, dan dikenal sebagai nukasin KQU-131 (Wilaipun *et al.* 2008). Satu galur *Lactobacillus plantarum* PMU33 yang diisolasi dari produk fermentasi ikan som-fak menghasilkan bakteriosin yang menghambat bakteri Gram positif, *L. monocytogenes*, *B. cereus* dan *S. aureus*. Bakteriosinnya stabil terhadap panas pada suhu autoklaf (121 °C selama 15 menit) dan aktif pada kisaran pH luas (2-10). Bakteriosin ini mempunyai dua peptida yang mirip dengan plantaricin W (Plw, yaitu Plw α dan

Plwß) (Noonpakdee *et al.* 2009). Berdasarkan hal ini maka ada kemungkinan untuk mendapatkan BAL penghasil bakteriosin asal bekasam.

Menurut Usmiati dan Marwati (2009) bakteriosin sebagai biopreservatif sangat potensial untuk mengontrol bakteri pada makanan dan produk makanan, akan tetapi secara komersial kurang dan mahal. Indonesia mempunyai banyak koleksi BAL yang dapat digunakan sebagai bahan untuk produksi bakteriosin. Akan tetapi, penelitian produksi bakteriosin masih kurang, karena itu penelitian ini butuh untuk dilakukan.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mendapatkan isolate BAL asal bekasam yang berpotensi tinggi sebagai penghasil bakteriosin.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Isolat BAL yang digunakan adalah isolat BAL yang diisolasi dari 8 sampel bekasam yang berasal dari 4 lokasi pengambilan sampel. Bakteri indikator yang digunakan untuk pengujian aktivitas antimikrob meliputi *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14028, *B. cereus*, *S. aureus* dan *L. monocytogenes*. Media yang digunakan untuk analisis mikrobiologi dan pertumbuhan BAL serta untuk uji aktivitas adalah Nutrient Agar (NA), de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA), de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB), Mueller hinton agar (MHA). Bahan kimia yang digunakan untuk pengendapan protein adalah amonium sulfat, Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 .

Alat-alat penelitian meliputi inkubator, clean bench, vortex mixer, magnetik stirrer, sentrifus, jarum inokulasi, pipet tetes, bunsen, pH meter, autoklaf, pengaduk, bulb, aluminium foil, cawan petri, tabung reaks, dan erlenmeyer.

Lingkup Penelitian

Penapisan senyawa bakteriosin

Isolat disegarkan dari gliserol ke MRSA miring, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Kultur di media MRSA miring diinokulasikan 1 ose kedalam MRSB 10 mL, kemudian diinkubasi selama 18 jam dengan kondisi mikroaerofilik, pada suhu 37 °C. Kemudian 1% (v/v) inokulum diinokulasikan

ke media MRSB 15 ml. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Supernatan bebas sel diperoleh dengan cara mensentrifugasi kultur cair (10.000 rpm, 15 menit, 4 °C).

Supernatan bebas sel kemudian diberi tiga perlakuan, yaitu tanpa perubahan pH, diset pada pH 5, dan pH 6 dengan menambahkan NaOH 1N. Kemudian supernatan tersebut diuji aktivitas penghambatan pada bakteri indikator dengan menggunakan metode difusi sumur agar. Bakteri indikator yang digunakan ialah *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14028, *B. cereus*, *S. aureus*, dan *L. monocytogenes*. Sebanyak 20 µL bakteri indikator dengan kepadatan sel 108 CFU/mL disuspensikan dalam 20 mL media MHA, kemudian dituang kedalam cawan petri steril, dibiarkan dingin dan membeku. Setelah membeku dibuat sumur dengan diameter 5 mm. Sebanyak 70 µL supernatan bebas sel yang sudah diberi perlakuan diatas dimasukkan kedalam sumur, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur diameternya. Zona hambat bakteriosin adalah diameter zona bening dikurangi dengan diameter sumur.

Pengendapan protein dengan amonium sulfat.

Isolat disegarkan dari gliserol ke MRSA miring, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Kultur di media MRSA miring diinokulasikan 1 ose kedalam MRSB 10 mL, kemudian diinkubasi selama 18 jam dengan kondisi mikroaerofilik, pada suhu 37 °C. Inokulum 1% dimasukkan dalam media produksi MRSB 100 mL, kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 37 °C, 150 rpm selama 24 jam. Kultur berumur 24 jam disentrifuse 10000 rpm, 10 menit, 4 °C. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dengan metode salting out dengan menambahkan amonium sulfat. Sebanyak 100 mL filtrat kultur diendapkan secara bertahap dengan menambahkan amonium sulfat mulai dari konsentrasi (0-10%) sampai konsentrasi akhir (70-80%) pada suhu 4 °C. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan pengaduk magnet dengan kecepatan lambat. Endapan protein dipisahkan dari cairannya menggunakan

sentrifugasi 10000 rpm, 15 menit, 4 °C. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 0,1 M buffer fosfat pH 5,3 dengan volume \pm 2 mL, kemudian masing-masing diuji aktivitas penghambatan pada bakteri indikator *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14028, dan *L. monocytogenes* menggunakan metode difusi sumur agar. Supernatan pengendapan juga diukur aktivitasnya. Supernatan dan hasil pengendapan diukur kadar proteinnya menggunakan metode Bradford.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan senyawa bakteriosin

Hasil penapisan senyawa bakteriosin dari 25 isolat BAL asal bekasam dengan kontrol negatif media MRSB dengan pH 4, 5 dan 6 disajikan pada Tabel 1. Semua perlakuan dari 25 isolat yang dicobakan supernatan bebas sel tanpa dinetralkan menghasilkan zona hambat kecuali pada isolat SK(19), BI(1) dan PS(14) tidak menghasilkan zona hambat pada kelima bakteri uji. Isolat SS(8) dan SI(3) hanya menghambat empat bakteri uji, sedangkan yang menghambat tiga bakteri uji ada 5 isolat (BI(2); BI(6), BI(15); BP(6) dan BP(7)) dan dua isolat, yaitu SS(10) dan BP(19) hanya menghambat dua bakteri uji.

Kontrol media MRSB dengan pH 4 menghasilkan zona hambat pada kelima bakteri uji sedangkan pada pH 5 dan 6 tidak menghasilkan zona hambat, hal ini menunjukkan bahwa asam laktat pada pH 5 dan 6 tidak bersifat antibakteri, sehingga apabila supernatan bebas sel yang diset pada pH 5 dan 6 menghasilkan zona hambat berarti hambatan tersebut dapat diduga bukan berasal dari asam yang dihasilkan, akan tetapi oleh senyawa antibakteri lain diantaranya adalah bakteriosin. Bakteriosin biasanya dihasilkan dalam substrat cair. Alakomi *et al.* (2000) menyatakan bahwa sifat antimikrob asam laktat karena rendahnya pH, 5mM (pH 4) asam laktat selalu menyebabkan permeabilisasi utama pada membran luar bakteri *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

Hasil penelitian menunjukkan ada 11 isolat (44%) dari 25 isolat yang menunjukkan zona hambat pada supernatan bebas sel dengan pH

5 dan atau 6. Sebelas isolat ini diduga sebagai penghasil bakteriosin. Setiap isolat menunjukkan penghambatan spesifik pada bakteri indikator tertentu. Papagiani *et al.* (2006) menyatakan bahwa batas sensitivitas dan respon yang linier terhadap bermacam-macam tingkat bakteriosin sangat berbeda nyata diantara mikroorganisme indikator yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan dari sembilan mikroorganisme indikator yang digunakan, hanya dua isolat darinya, yaitu *L. curvatus* ATCC 51436 dan *P. acidilactici* ATCC 25740 yang sensitif terhadap konsentrasi nisin yang sangat rendah dan menghasilkan tipe respon yang linier baik pada metode difusi cawan agar atau uji tubidimetri.

Pengendapan protein dengan amonium sulfat.

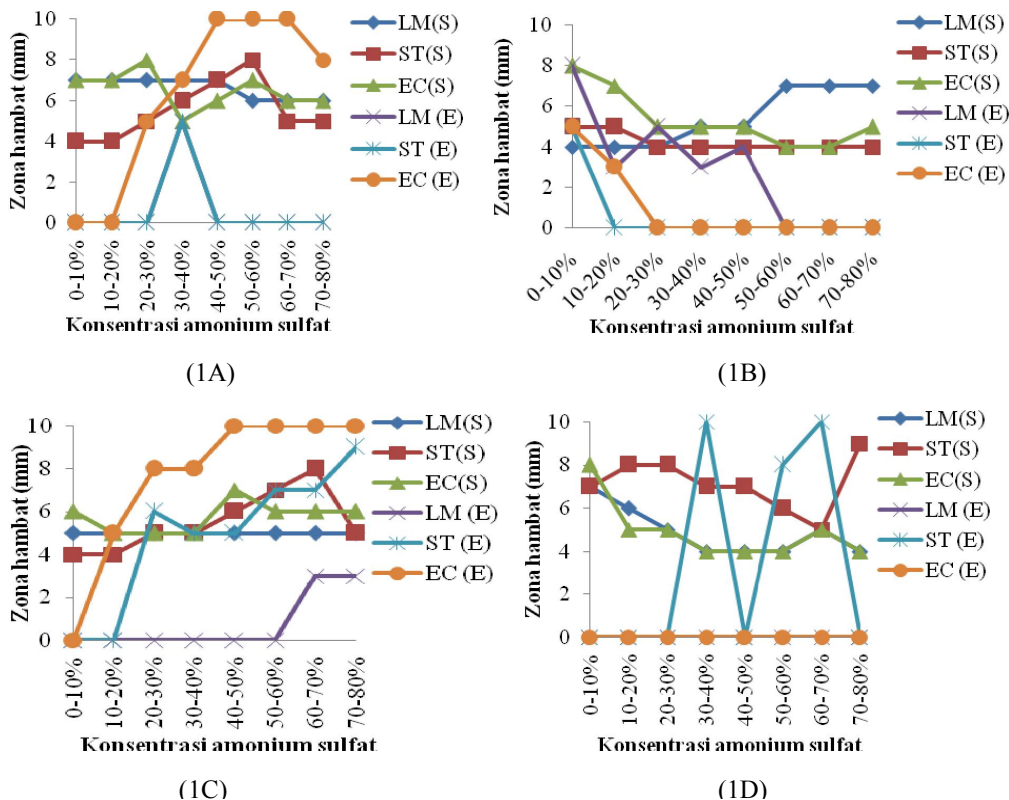
Pengendapan protein dilakukan dari supernatan bebas sel yang berasal dari empat isolat (BI(3), BP(3), BP(20), dan SK(5)) terpilih yang diduga berpotensi menghasilkan bakteriosin. Pengendapan protein menggunakan amonium sulfat dengan pemekatan secara bertingkat dari 0-10% sampai 70-80% terhadap supernatan bebas sel. Pingitore *et al.* (2007) menyatakan bahwa karena proteinnya itu alami, bakteriosin dapat dikonsentratkan melalui aplikasi metoda salting-out, dan yang paling sering digunakan adalah amonium sulfat. Bakteriosin biasanya dihasilkan dalam substrat cair. Hasil pengendapan bakteriosin dari keempat isolat dan aktivitasnya terhadap bakteri indikator *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* dan *E. coli* serta konsentrasi protein pada supernatan dan endapan disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Supernatan hasil pengendapan pada semua konsentrasi amonium sulfat pada keempat isolat menunjukkan penghambatan terhadap ketiga bakteri indikator, akan tetapi endapan dari hasil pengendapan protein dari keempat isolat menunjukkan adanya zona hambat yang berbeda terhadap ketiga bakteri indikator pada konsentrasi amonium yang berbeda. Zona hambat supernatan tertinggi pada isolat BI(3) sebesar 8 mm terhadap *S. typhimurium* dan *E. coli* yaitu masing-masing pada pemekatan 50-60% dan 20-30%, sedangkan zona hambat endapan tertinggi sebesar 10

Tabel 1 Aktivitas hambat senyawa antibakteri (mm) dari supernatan bebas sel yang tidak dinetralkan dan yang diset pada pH 5 dan 6 dari 25 isolat

No.	Isolat	pH kultur 18 jam	Aktivitas hambat senyawa antibakteri (mm)												
			<i>L. monocytogenes</i>			<i>S. typhimurium</i>			<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>B. cereus</i>
			SBS pH 5	SBS pH 6	SBS	SBS pH 5	SBS pH 6	SBS	SBS pH 5	SBS pH 6	SBS	SBS pH 5	SBS pH 6	SBS pH 5	SBS pH 6
1	SS (8)	4,5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	3	-
2	BP(1)	4,5	-	-	3	-	-	4	-	-	5	-	-	3	-
3	BP (8)	4,0	-	-	5	-	-	6	-	-	5	-	-	3	-
4	SS (10)	4,5	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
5	SK (5)	4,0	-	-	6	-	-	7	-	-	7	-	-	4	-
6	SK (19)	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	NS (5)	4,0	-	-	6	-	-	6	-	-	7	-	-	5	-
8	PS (16)	4,0	-	-	5	-	-	4	-	-	5	-	-	4	-
9	BI (2)	4,5	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
10	BI (1)	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	BP (10)	4,0	-	-	6	-	-	4	-	-	5	-	-	5	-
12	BP(19)	4,5	-	-	-	-	-	4	-	-	3	-	-	-	-
13	BP(20)	4,0	-	-	3	-	-	4	-	-	5	-	-	3	-
14	BI(6)	4,5	-	-	-	-	-	4	-	-	4	-	-	3	-
15	BI(15)	4,5	-	-	3	-	-	4	-	-	4	-	-	-	-
16	SS(8)	4,0	-	-	3	-	-	4	-	-	5	-	-	4	-
17	BP(3)	4,0	-	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2	-
18	BP(7)	4,0	-	-	5	-	-	4	-	-	2	-	-	2	-
19	SK(15)	4,0	-	-	6	-	-	7	-	-	7	-	-	7	2
20	SS(3)	4,0	-	-	5	-	-	6	-	-	6	-	-	6	-
21	SS(5)	4,0	-	-	6	-	-	6	-	-	5	-	-	6	-
22	BP(6)	4,0	-	-	4	-	-	2	-	-	5	-	-	6	-
23	SI(3)	4,0	-	-	-	-	-	3	-	-	3	-	-	-	-
24	BI(3)	4,0	-	-	3	-	-	3	-	-	5	-	-	4	-
25	PS(14)	4,5	-	-	-	-	-	4	-	-	4	-	-	3	-
26	K(4)	4	3	-	6	-	-	5	-	-	7	-	-	6	-
27	K(5)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	K(6)	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: SBS = supernatan bebas sel, K(4), K(5) dan K(6) = kontrol negatif, media MRSB dengan pH 4, pH 5 dan pH 6



Gambar 1 Aktivitas antibakteri dari supernatan dan endapan pada isolat BI(3) (1A), BP(3) (1B), BP(20) (1C) dan SK (5) (1D). Keterangan: LM (*L. monocytogenes*), ST (*S. typhimurium*), EC (*E.coli*), (S=supernatan hasil pengendapan, E=endapan).

mm terhadap *E.coli* pada pemekatan 40-50% sampai 70-80%, zona hambat juga terdapat pada pemekatan 20-30% dan 30-40%. Zona hambat terhadap *L. monocytogenes* dan *S. typhimurium* hanya pada pemekatan 30-40% sebesar 5 mm (Gambar 1A).

Zona hambat supernatan tertinggi pada isolat BP(3) sebesar 7 mm terhadap *L. monocytogenes* yaitu masing-masing pada pemekatan 50-60% sampai 70-80%, sedangkan zona hambat endapan tertinggi sebesar 8 mm terhadap *L. monocytogenes* pada pemekatan 0-10%, zona hambat juga terdapat pada pemekatan 10-20% sampai 40-50% yang cenderung menurun. Zona hambat terhadap *S. typhimurium* hanya pada pemekatan 0-10% sebesar 5 mm dan terhadap *E.coli* pada pemekatan 0-10% dan 10-20% yang masing-masing sebesar 5 mm dan 3 mm (Gambar 1B).

Zona hambat supernatan tertinggi pada isolat BP(20) sebesar 8 mm terhadap *S. typhimurium* yaitu pada pemekatan 60-70%, sedangkan zona hambat endapan tertinggi sebesar 10 mm terhadap

E.coli pada pemekatan 40-50% sampai 70-80%, zona hambat juga terdapat pada pemekatan 10-20% sampai 30-40%. Zona hambat terhadap *L. monocytogenes* hanya pada pemekatan 60-70% dan 70-80%, dan terhadap *S. typhimurium* meningkat dari pemekatan 20-30% sampai 70-80% dengan zona hambat berkisar 5-9 mm (Gambar 1C).

Supernatan hasil pengendapan pada semua konsentrasi amonium sulfat menunjukkan penghambatan terhadap ketiga bakteri indikator, hal yang sama juga terjadi pada isolat SK(5), zona hambat tertinggi sebesar 9 mm terhadap *S. typhimurium* pada pemekatan 70-80%, sedangkan zona hambat endapan tertinggi sebesar 10 mm terhadap *S. typhimurium* pada pemekatan 30-40% dan 60-70%, zona hambat juga terdapat pada pemekatan 50-60% sebesar 8 mm, sedangkan terhadap *L. monocytogenes* dan *E. coli* tidak menunjukkan adanya zona hambat pada semua konsentrasi ammonium sulfat (Gambar 1D).

Supernatan hasil pengendapan protein secara

bertingkat dengan amonium sulfat (konsentrasi 0-10% sampai 70-80%) pada keempat isolat yang dicobakan secara umum menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap ketiga bakteri indikator dengan zona hambat 4,0-9,0 mm, hal ini menunjukkan bahwa pada supernatan menghasilkan senyawa antibakteri yang bersifat asam atau berupa diasetil. Adanya asam organik menyebabkan pH menjadi asam, kemudian kombinasi pH rendah dan asam organik ini dapat membunuh bakteri pembusuk dan patogen. Asam organik yang biasanya diasosiasikan dengan bakteri asam laktat adalah asam laktat, asam propionat, dan asam asetat yang diproduksi dalam jumlah yang kecil. Asam laktat berperan dalam proses penghambatan bakteri lain. Alakomi *et al.* (2000) menyatakan bahwa sifat antimikrob asam laktat karena rendahnya pH, 5mM (pH 4) asam laktat selalu menyebabkan permeabilisasi utama pada membran luar bakteri *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

Hasil penelitian secara umum menunjukkan bahwa *S. typhimurium* dan *E. coli* lebih sensitif terhadap senyawa antibakteri dari supernatan yang dihasilkan oleh isolat BI(3), BP(20) dan SK(5), sedangkan *L. monocytogenes* lebih sensitif terhadap isolat BP(3). Theron dan Lues (2011) menyatakan bahwa setiap bakteri indikator memiliki ketahanan masing-masing terhadap jenis asam organik yang berbeda. *L. monocytogenes* memiliki kerentanan yang lebih besar terhadap asam laktat dibandingkan dengan asam asetat. *E. coli* dan *S. typhimurium* memiliki kerentanan yang tinggi terhadap asam laktat dan asam asetat. Cheng *et al.* (2003) juga melaporkan bahwa asam laktat lebih lethal daripada asam asetat untuk *E. coli* O157:H7, sedangkan menurut Alvarez-Ordenez *et al.* (2009), *S. typhimurium* memiliki kemampuan bertahan hidup pada pH ekstrem, yaitu 3, namun kemampuan hidup pada pH ekstrem tersebut tidak menjadikan bakteri ini dapat hidup dengan normal ketika bereaksi dengan asam organik.

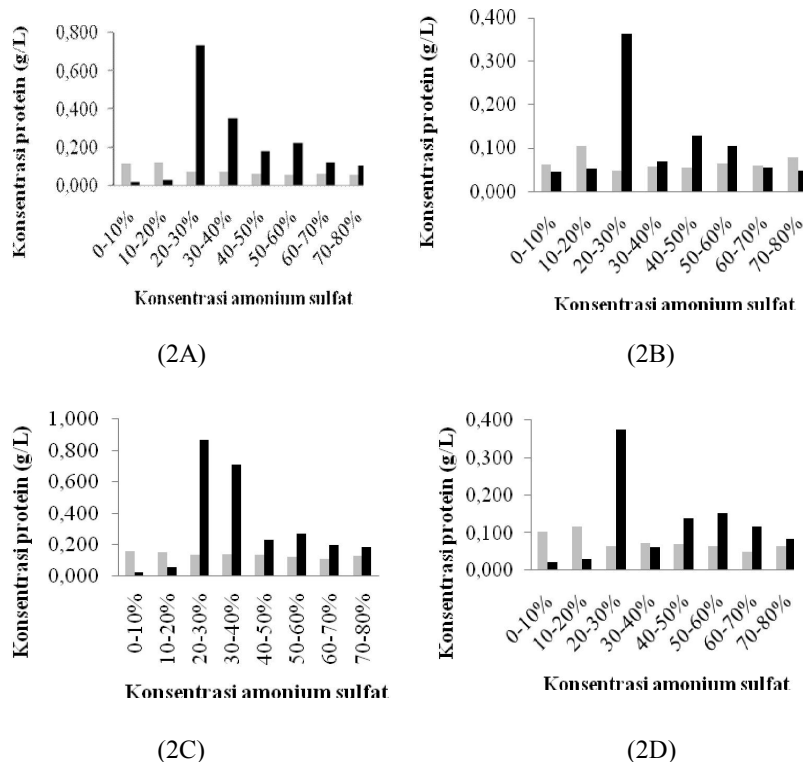
Theron dan Lues (2011) menyatakan bahwa asam terdisosiasi menjadi ion hidrogen dan anion toksik yang mampu mengganggu fungsi fisiologis sel dan mendestabilasi protein sel. Pelaez dan

Orue (2010) menyatakan bahwa asam laktat mampu melemahkan permeabilitas bakteri Gram negatif dengan merusak membran luar bakteri Gram negatif. Asam laktat merupakan molekul yang larut dalam air sehingga mampu menembus ke dalam periplasma bakteri Gram negatif melalui protein porin pada membran luarnya. Pelindung dari permeabilitas membran luar berupa lapisan lipopolisakarida yang terletak pada permukaan membran dirusak oleh asam laktat sehingga substrat antibakteri yang lain yaitu diasetil, bakteriosin, hidrogen peroksida dan lactoperidase system dapat berpenetrasi ke dalam membran sitoplasma.

Endapan hasil pengendapan protein secara bertingkat dengan amonium sulfat (konsentrasi 0-10% sampai 70-80%) pada keempat isolat yang dicobakan secara umum menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang berbeda terhadap ketiga bakteri indikator dengan zona hambat berkisar antara 3,0-10,0 mm, hal ini menunjukkan bahwa pada endapan menghasilkan senyawa antibakteri dari senyawa protein dan diduga adalah bakteriosin. Adanya perbedaan penghambatan terhadap ketiga bakteri indikator pada setiap konsentrasi amonium sulfat menunjukkan senyawa protein aktif yang juga berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. typhimurium* lebih sensitif terhadap senyawa antibakteri dari endapan yang dihasilkan oleh isolat SK(5); *E. coli* lebih sensitif terhadap isolat BI(3) dan BP(20), sedangkan *L. monocytogenes* lebih sensitif terhadap isolat BP(3). Masing-masing dengan konsentrasi amonium yang berbeda.

Pengendapan dengan penambahan garam netral adalah metode yang paling umum digunakan untuk fraksinasi protein dengan pengendapan. Protein yang diendapkan tidak didenaturasi dan aktivitasnya diambil kembali dengan melarutkan kembali pelet hasil sentrifugasi. Penambahan garam ini dapat menstabilkan protein terhadap denaturasi, proteolisis atau kontaminasi bakteri. Salting out tergantung pada hidrofobik alami permukaan protein. Kelompok hidrofobik lebih banyak pada interior protein tetapi beberapa berlokasi pada permukaan, seringkali di bagian



Gambar 2 Konsentrasi protein dari supernatan () dan endapan () pada isolat BI(3) (2A), BP(3) (2B), BP(20) (2C), dan SK (5) (2D).

patches. Patches hidrofobik pada satu molekul protein dapat berinteraksi dengan yang lain. Protein dengan patches hidrofobik yang lebih besar akan berkumpul dan mengendap sebelum patches yang lebih kecil, menghasilkan fraksinasi. Agregat (kumpulan) yang terbentuk adalah campuran dari beberapa protein dan ini akan mempengaruhi konsentrasi garam yang dibutuhkan untuk mengendapkan protein yang diinginkan (Harris 2001). Bagian hidrofobik di dalam molekul bakteriosin merupakan hal yang diperlukan untuk aktivitasnya dalam menghambat bakteri sensitif karena inaktivasi mikroorganisme oleh bakteriosin tergantung pada interaksi hidrofobik antara sel-sel bakteri dengan molekul-molekul bakteriosin (Parada *et al.* 2007).

Konsentrasi protein pada endapan dari isolat BI(3) jauh lebih tinggi dibandingkan dengan supernatan, dengan konsentrasi protein pada endapan sebesar 0,014-0,735 g/L dan pada supernatan sebesar 0,051-0,191 g/L (Gambar 2A), hal yang sama juga terjadi pada isolat BP(20) dengan konsentrasi protein endapan sebesar 0,023-0,870 g/L sedangkan pada supernatan sebesar

0,107-0,159 g/L (Gambar 2C). Konsentrasi protein dari endapan isolat BP(3) dan SK(5) lebih kecil dibandingkan dengan isolat BI(3) dan BP(20), yaitu masing-masing sebesar 0,045-0,363 g/L (Gambar 2B) dan sebesar 0,021-0,376 g/L (Gambar 2D) sedangkan pada supernatan masing-masing sebesar 0,055-0,104 g/L (Gambar 2B) dan sebesar 0,048-0,117 g/L (Gambar 2D), hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri pada endapan berupa protein atau dengan kata lain adalah bakteriosin. Supernatan yang konsentrasi proteinnya lebih rendah juga menghasilkan zona hambat yang relatif tinggi pada semua konsentrasi, hal ini dapat diduga bahwa aktivitas antibakteri pada supernatan disebabkan oleh adanya senyawa asam organik yang menyebabkan pH supernatan cenderung asam yaitu sekitar pH 4. Gálvez *et al.* (2007) menyatakan BAL dapat memproduksi beberapa senyawa antimikrob seperti asam organik (asam laktat dan asetat), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin. Bakteriosin merupakan antimikrob peptida yang disintesis oleh ribosom dan dapat membunuh bakteri yang berhubungan erat dengan penghasil bakteriosin.

KESIMPULAN

Penapisan senyawa bakteriosin dari 25 isolat BAL asal bekasam menunjukkan bahwa ada 11 isolat (44%) yang diduga berpotensi sebagai penghasil bakteriosin, dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes*. Setiap isolat menunjukkan penghambatan spesifik pada bakteri indikator tertentu. Supernatan dan endapan dari hasil pengendapan protein secara bertingkat dengan amonium sulfat (konsentrasi 0-10% sampai 70-80%) pada keempat isolat (BI(3), BP(3), BP(20) dan SK(5)) terpilih menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri indikator *E. coli*, *S. typhimurium* ATCC 14028, dan *L. monocytogenes* dengan zona hambat sekitar 3,0 - 10,0 mm. Adanya zona hambat pada supernatan diduga senyawa aktifnya adalah asam organik, sedangkan pada endapan senyawa aktifnya adalah protein yang diduga sebagai bakteriosin. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat BP(3) lebih sensitif terhadap *L. monocytogenes*, sedangkan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat BI(3), BP(20) dan SK(5) secara umum lebih sensitif terhadap *S. typhimurium* dan atau *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez-Ordóñez A, Fernández A, Bernardo A, López M. 2009. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety. *Journal Meat Science* 81(1): 65-70.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):2001-2005.
- Cheng, HY, Ye RC, Chou CC. 2003. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Research International* 36:49-56.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation [Review]. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20
- Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51-70.
- Harris ELV. 2001. Concentration of the extract. Di dalam: Roe S. (Ed). *Protein Purification Techniques*. Second Edition. New York: Oxford University Press. Hlm 135-139.
- Kopermsub P, Vichitphan S, Yunchalard S. 2006. Lactic acid bacteria isolated from Plaa-som, a Thai fermented fish product. *Thailand Journal Biotechnology* 7(1):32-39.
- Noonpakdee W, Jumriangrit P, Wittayakom K, Zendo J. 2009. Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17(1):19-25.
- Ostergaard A, Ben E, Mbarek PK, Yamprayoon J, Wedel-Neergaard C, Huss HH, Gram L. 1998. Fermentation and spoilage of som-fak a Thai low-salt fish product. *Tropical Science* 38:105-112.
- Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. 2007. Bacteriocin from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(3):521-542.
- Pelaez SM, Orue SM. 2010. Feeding strategies for the control of *Salmonella* in pigs. *Food Science and Technology Bulletin* 5(1):39-47.
- Pingitore EV, Salvucci E, Sesma F, Nader-Macias ME. 2007. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). Dalam: Vilas AM (Ed.) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trend in Applied Microbiology*. Hlm 557-568.
- Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G, Dasiou D, Ambrosiadis I. 2006. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories* 5:1-14.
- Paludan-Muller C, Madsen M, Sophanodora P, Gram L, Møller PL. 2002. Fermentation and microflora of plaa-som, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 73:61-70.
- Prionnual S, Yanagida F, Lin LH, Hsiao KN, Chen Y. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from Plaa-Som, a fermented fish product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7):2247-2250.
- Theron MM, Lues JFR. 2011. *Organic Acids and Food Preservation*. United states: CRC Press. Hlm: 273.
- Tanasupawat S, Okada S, Komagata K. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology* 44:193-200.
- Tahara T, Oshimura M, Umezawa C, Kanatani K. 1996. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132 a two-

- compound bacteriocin produce by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Applied and Environmental Microbiology* 62:892-897.
- Usmiati S, Marwati T. 2009. Selection and optimization process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. *Indonesian Journal of Agriculture* 2(2): 82-92.
- Wilaipun P, Zendo T, Okuda K, Nakayama J, Sonomoto K. 2008. Identification of the nukacin KQU-131 a new type-A(III) lantibiotic produced by *Staphylococcus homini* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-ra). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72(8):2232-2235