

**LAPORAN PENELITIAN  
PELAKSANAAN KEGIATAN HIBAH STRATEGI NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2009**



**EKSPLORASI DAN AKTIVITAS DARI BAKTERI ASAM LAKTAT  
SEBAGAI PENGAWET ALAMI PADA BIOPRESERVASI BAHAN  
PANGAN ASAL HEWAN**

**Peneliti :**

**Dr. Nenny Harijani, drh., MSi.  
NIP. 131 760 372**

**Emy Koestanti Sabdoningrum, drh., MKes.  
NIP. 132 240 300**

**Sumber Dana: DIPA/APBN Rupiah Murni Tahun Anggaran 2009  
Universitas Airlangga  
2009**

**LAPORAN PENELITIAN  
PELAKSANAAN KEGIATAN HIBAH STRATEGI NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2009**



**EKSPLORASI DAN AKTIVITAS DARI BAKTERI ASAM LAKTAT  
SEBAGAI PENGAWET ALAMI PADA BIOPRESERVASI BAHAN  
PANGAN ASAL HEWAN**

**Peneliti :**

**Dr. Nenny Harijani,drh.,MSi.**

**NIP.131 760 372**

**Emy Koestanti Sabdoningrum,drh.,MKes.**

**NIP. 132 240 300**

**Sumber Dana: DIPA/APBN Rupiah Murni Tahun Anggaran 2009  
Universitas Airlangga  
2009**

**HALAMAN PENGESAHAN**

1. Judul : EKSPLORASI DAN AKTIVITAS DARI BAKTERI ASAM LAKTAT  
SEBAGAI PENGAWET ALAMI PADA BIOPRESERVASI BAHAN  
PANGAN ASAL HEWAN

2. Ketua Peneliti :  
a. Nama : Dr. Nenny Harijani,MSi.,Drh  
b. Jenis Kelamin : Perempuan  
c. Nip : 131 760 372  
d. Jabatan Fungsional : lektor  
e. Jabatan Struktural : Kepala Departemen Kesmavet  
f. Bidang Keahlian : Kesmavet  
g. Fakultas : Kedokteran Hewan  
h. Universitas : Airlangga  
i. Tim Peneliti :

No.	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Dr. Nenny Harijani, Drh., MSi	Mikrobiologi Pangan	FKH Unair	10 jam/minggu
2.	Emy KoestantiS., Drh, MKes	Kesmavet	FKH Unair	10 jam/minggu

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

a. Jangka waktu Penelitian yang diusulkan : 10 bulan  
b. Biaya Total yang Diusulkan : Rp. 100.000.000(Seratus Juta Rupiah)  
c. Biaya yang Disetujui Tahun 2009 : Rp. 60.000.000(enam puluh juta rupiah)

Mengetahui  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
  
Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh  
NIP.130 687 305


Surabaya, 14 Nopember 2009

Ketua Pelaksana

  
Dr. Nenny Harijani,MSi.,Drh.  
NIP. 131 760 372



Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Airlangga

  
Prof. Dr. Bambang Sekltari Lukiswanto., DEA.,Drh.  
NIP. 131 837 004

**LAPORAN PENELITIAN**  
**PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN HIBAH STRATEGIS NASIONAL**  
**TAHUN ANGGARAN 2009**

Kategori :  
 Univ/Inst./Akademi : Airlangga  
 Nama Ketua Peneliti : Dr.Nenny Harijani,drh.,MSi.

Tahun : 2009  
 Fakultas : Kedokteran hewan

**1. KETERANGAN UMUM**

**1. Judul :** **EKSPLORASI DAN AKTIVITAS DARI  
 BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI PENGAWET  
 ALAMI PADA BIOPRESERVASI BAHAN PANGAN  
 ASAL HEWAN**

2.Dibiayai melalui proyek:DIPA RUPIAH MURNI UNIVERSITAS  
 AIRLANGGA

Nomor : 319/h3.13/PPd/2009  
 Tanggal : 23 Maret 2009

3.Jumlah biaya penelitian: Rp. 60.000.000,-( Enam puluh juta rupiah )

4.Jangka waktu penelitian: 8 bulan, mulai tgl 16 Maret s.d. 16 Nopember 2009

5.Personalia penelitian :

No.	Nama	Asal Fakultas	Tugas
1.	Dr.Nenny Harijani,drh.,MSi.	FKH	Peneliti utama
2.	Emy Koestanti S.,drh.,MKes.	FKH	Anggota peneliti

**6.Lokasi Penelitian**

Lokasi/Laboratorium	Alamat	Pemilik/Pengelola
Kesmavet	FKH-UNAIR	FKH-UNAIR
Diagnostik	FKH-UNAIR	FKH-UNAIR

7. Uraian yang telah dilakukan termasuk bahan, desain dan instrumen penelitian, metoda, hasil dan pembahasan, kesimpulan serta laporan akhir



## RINGKASAN

Penelitian tentang **Eksplorasi dan Aktivitas dari Bakteri Asam Laktat sebagai Pengawet Alami pada Biopreservasi Bahan Pangan Asal Hewan** telah dilakukan pada bulan April 2009 sampai bulan Oktober 2009.

Penelitian dilakukan secara bertahap yaitu meliputi penelitian di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner dan di Laboratorium Diagnostik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Maksud dan tujuan penelitian (1) mengisolasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin sebagai antibakteri berasal dari usus sapi potong (2) mengungkap lebih jauh bakteriosin sebagai antibakteri pada biopreservasi bahan pangan asal hewan yaitu susu pasteurisasi. Penelitian ini meliputi beberapa tahap yaitu tahap pertama: isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin serta karakterisasi bakteriosin, tahap kedua meliputi aplikasi bakteriosin untuk biopreservasi bahan pangan asal hewan yaitu susu pasteurisasi.

Isolat bakteri asam laktat berasal dari usus sapi potong yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH), media yang digunakan yaitu *Mann Rogosa Sharpe* (MRS-Oxoid-CM 0359), isolat bakteri asam laktat selanjutnya dilakukan seleksi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dengan cara pemupukan pada medi MRS Agar yang dilapisi dengan media *Brain Heart Infusion* (BHI Agar-Oxoid) yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator yaitu *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Escherichia coli* (ITB-CC-B87), *Streptococcus agalactiae* (ITB-CC-B124). Identifikasi bakteri asam laktat meliputi morfologi, sifat Gram dan uji biokimiawi.

Bakteriosin selanjutnya dikarakterisasi meliputi uji terhadap resistensi panas, resistensi enzim, resistensi zat organik dan uji aktivitas terhadap bakteri indikator yaitu *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Escherichia coli* (ITB-CC-B87), *Streptococcus agalactiae* (stok isolat Lab.Mikrobiolgi FKH IPB), *Lactobacillus plantarum* (ITB-CC-B124).

Penelitian tahap kedua adalah aplikasi bakteriosin pada biopreservasi susu pasteurisasi. Pada tahap ini bertujuan untuk mengetahui potensi bakteriosin sebagai antibakteri pada biopreservasi susu pasteurisasi dan mengetahui keadaan susu pasteurisasi berdasarkan kualitas secara mikrobiologik. Dosis bakteriosin yang digunakan untuk biopreservasi susu pasteurisasi adalah 200 AU.

Morfologi bakteri asam laktat adalah kokus, bersifat Gram positif, memfermentasikan glukosa, laktosa, maltosa. Bakteriosin mempunyai karakteristik resisten terhadap panas pada suhu 80<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit dan 100<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit, diinaktivasi oleh enzim trypsin dan pepsin, tidak diinaktif oleh enzim lipase, mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Escherichia coli* (ITB-CC-B87), *Streptococcus agalactiae* (stok isolat Lab.Mikrobiolgi FKH IPB) dan *Lactobacillus plantarum* (ITB-CC-B124).

Bakteriosin berperan mempertahankan kualitas susu pasteurisasi secara mikrobiologik dan dapat mengurangi jumlah total bakteri susu pasteurisasi selama penyimpanan sampai 14 hari pada suhu 4<sup>0</sup>C.

## PENDAHULUAN

### Latar belakang

Bahan pangan asal hewan seperti susu, daging dan ikan merupakan produk pangan asal hewan yang mudah rusak dan merupakan produk yang mempunyai resiko tinggi yaitu mempunyai kecenderungan mudah terkontaminasi oleh bakteri, tidak tahan lama, sehingga mengganggu terhadap keamanan produk menjadi tidak aman dan tidak sehat dikonsumsi. Hal tersebut dapat mengganggu terhadap kesehatan masyarakat dan ketentraman batin masyarakat. Untuk melindungi kesehatan masyarakat dan ketentraman batin masyarakat, perlu suatu tindakan dan penanganan terhadap bahan pangan tersebut agar aman, sehat, utuh dan halal (ASUH). Salah satu usaha ialah dengan pemanfaatan bakteri asam laktat dan metabolitnya yaitu bakteriosin sebagai antibakteri atau kontrol pada biopreservasi bahan pangan asal hewan (susu).

Bakteriosin merupakan hasil metabolit dari Bakteri Asam Laktat (BAL) dan merupakan antibakteri dapat dimanfaatkan sebagai Biopreservasi bahan pangan asal hewan seperti susu, daging serta hasil perikanan. Bakteriosin merupakan senyawa protein terdiri dari polipeptida sebagai antibakteri yang bersifat bakterisida dan bakteristatik, disintesis oleh sistem ribosom (Kemperman *et al.*, 2003). Aplikasi bakteriosin sebagai biokontrol pada preservasi produk pangan yaitu dapat secara langsung dengan bakteriosin yang berasal dari supernatan kultur strain bakteri asam laktat (Martinez *et al.*, 2000).

### Tujuan khusus Penelitian

Tujuan khusus penelitian (1) mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) penghasil bakteriosin sebagai antibakteri (2) mengungkap lebih jauh bakteriosin sebagai antibakteri pada biopreservasi bahan pangan asal hewan berdasarkan kualitas mikrobiologik (3) menggali dan mengungkap karakteristik Bakteri asam laktat penghasil bakteriosin sebagai antimikroba pada biopreservasi bahan pangan asal hewan yang aman.

Penelitian ini meliputi beberapa tahap yaitu tahap pertama: isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin, tahap kedua meliputi aplikasi bakteriosin untuk biopreservasi bahan pangan asal hewan.

Kegunaan praktis hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan dan diaplikasikan pada tindakan biopreservasi bahan pangan asal hewan, sehingga akan diperoleh produk pangan yang aman, sehat, utuh dan halal (ASUH). Pada industri pengolahan pangan asal hewan dapat dijadikan acuan pada salah satu jaminan mutu dan keamanan produk olahan asal hewan sehingga dapat memproteksi rantai proses produksi pangan olahan asal hewan tersebut yaitu memperpanjang masa simpan produk serta meminimalkan resiko bahaya kontaminasi mikrobiologik dan aman terhadap kesehatan konsumen

### **Urgensi (keutamaan) Penelitian**

Pangan asal hewan seperti daging, susu, ikan dan hasil olahannya merupakan produk yang berisiko tinggi (*high risk food*) karena mudah rusak (*perishable food*). Produk pangan tersebut mudah terkontaminasi oleh bakteri patogen maupun tidak patogen dan dapat menyebabkan kerusakan atau kebusukan, tidak tahan lama selama penyimpanan dan pendistribusian sehingga sering tidak aman dikonsumsi, bahkan dapat sebagai sumber penularan *food borne diseases*.

Keamanan pangan masih merupakan salah satu masalah yang dapat mengganggu kesehatan masyarakat. Hal tersebut seperti terjadi pada pemalsuan bahan pangan, keraguan terhadap sertifikat halal, perubahan dalam proses, penanganan yang salah, sanitasi kurang, kontaminasi atau pencemaran oleh bakteri, virus, residu antibiotika, pestisida, logam berat dan bahan pengawet yang tidak aman untuk dikonsumsi. Untuk melindungi kesehatan masyarakat tersebut di atas perlu dilakukan suatu tindakan dan penanganan legalitas terhadap bahan pangan asal hewan, atau produk olahan asal hewan tersebut.

Perkembangan teknologi yang semakin pesat, terjadi perubahan pola hidup yang menuntut segala sesuatu lebih praktis. Demikian pula kualitas dan keamanan pangan akan selalu menjadi perhatian dan pertimbangan konsumen. Penelitian pemanfaatan dan penggunaan bakteri asam laktat (BAL) dan hasil metabolitnya untuk berbagai aplikasi pada ternak, pakan, pangan dan produk olahan pangan mulai berkembang dan salah satu aplikasinya dapat sebagai pengawetan secara alami bahan pangan asal hewan.



Hasil metabolit bakteri asam laktat yaitu bakteriosin merupakan zat yang dapat membunuh bakteri dan dapat digunakan untuk usaha pengawetan secara biologik (biopreservasi) pada bahan pangan dan memperpanjang masa simpan dan keamanan pangan (Sudirman dkk., 1995; Post, 1996; Mullen dan Stilles, 1996; Harijani, 1997). Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai *food supplement* pada minuman sehat, khususnya produk susu hasil fermentasi antara lain *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacteria spp.*, *Lactobacillus reuteri*.

Proses preservasi dengan pemanfaatan bakteri asam laktat dapat menghasilkan metabolit yaitu asam laktat, asetat, diasetil,  $H_2CO_3$ ,  $H_2O_2$ , bakteriosin dan reuterin (Nettles dan Barefoot, 1993; Liao dan Yousef, 1994; Ray, 1996), yang semuanya merupakan bahan pengawet alami.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat merupakan zat yang mempunyai daya antibakteri terdiri atas polipeptida hasil sintesis sistem ribosom, mempunyai aktivitas terhadap bakteri pembusuk dan bakteri patogen penyebab penyakit serta aktif sebagai fungisida (Cuesta *et al.*, 2000; Leroy dan De Vuyst, 1999; Okkers *et al.*, 1999 dalam Magnusson dan Schnurer, 2001). Penggunaan bakteri asam laktat itu sendiri pada produk pangan telah banyak dilakukan yang berperan terhadap flavor, aroma dan memperpanjang masa simpan produk fermentasi (Kunne *et al.*, 2000)

## TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Bakteri Asam Laktat

#### 2.1.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang tergolong gram positif, tidak berspora, katalase negatif, aerob, *fastidious* dan tahan asam. Kelompok bakteri ini dikategorikan sebagai *food grade microorganism* yaitu spesies bakteri asam laktat yang menguntungkan terutama terhadap kesehatan. Bakteri asam laktat yang termasuk kelompok ini antara lain *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium spp.*, serta beberapa spesies bakteri asam laktat *non intestinal* yaitu *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactococcus lactis* (Ray, 1996).

Bakteri asam laktat terdapat pada hewan, sayuran, susu sapi dan manusia serta produk pangan hasil fermentasi (Leroy dan De Vuyst, 1999; Medine *et al.*, 2001; Benkerroum *et al.*, 2002). Bakteri asam laktat *indigenous* yang dapat diisolasi dari susu adalah *Enterococcus lactis* subsp. *lactis* dan subsp. *cremoris*, *Leuconostoc* dan *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, sedangkan yang diisolasi dari keju antara lain *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus acidophilus* (Medine *et al.*, 2000). Beberapa spesies BAL termasuk dalam kelompok probiotik, Fuller (1992) mendefinisikan probiotik adalah suplemen makanan berupa bakteri hidup yang menguntungkan dengan jalan memperbaiki keseimbangan bakteri di dalam usus. Bakteri asam laktat yang dikelompokkan sebagai probiotik antara lain *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium spp.* *Lactobacilli thermophilic*, *Lactobacillus delbrueckii* dan *Lactobacillus helveticus*. Probiotik tersebut digunakan pada bioteknologi yaitu penting untuk produksi keju dan susu fermentasi. (Neu dan Henrich, 2003). Saat ini beberapa peneliti memfokuskan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin untuk digunakan pada pengawetan bahan pangan (Hindre *et al.*, 2003).

Bakteri asam laktat mempunyai karakteristik yaitu berbentuk batang pendek, tidak berspora, tumbuh pada pH 5,5–5,8, fermentatif, memproduksi asam laktat (Varnam 2002). *Lactobacillus rhamnosus* HN001 dengan pemanasan pada suhu 45<sup>0</sup>C selama 30 menit tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan, sedangkan pada pemanasan 50<sup>0</sup>C akan

terjadi penekanan pertumbuhan dan dengan pemanasan pada temperatur 55<sup>0</sup>C terjadi penekanan pertumbuhan sampai 100% (Prasad *et al.*, 2003). Pada penyimpanan kultur kering stabil pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 14 minggu. *Lactobacillus sp.* stabil terhadap panas, umumnya mempunyai habitat pada saluran pencernaan dan sebagai mikroflora indigenus (Lee dan Salminen, 1995 *didalam* Neu dan Henrich, 2003)

Bakteri asam laktat menghasilkan metabolit yaitu berupa protein kompleks, protein tersebut sebagai antibakteri mempunyai aktivitas berbeda terhadap spesies lain dari bakteri asam laktat, tumbuh pada media *De Mann Rogosa Sharpe* (MRS) pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam dan tumbuh pada pH 5 – 6,8 (Krier *et al.*, 1998, Cataloluk, 2001).

## 2.2. Peranan Bakteri Asam Laktat

Peranan bakteri asam laktat sebagai starter pada proses pembuatan keju dan pengawetan susu adalah membentuk flavor, aroma, dan memperpanjang masa simpan produk pangan, bakteri asam laktat yang biasa digunakan adalah *Lactococcus lactis subsp.lactis* dan *Lactococcus lactis subsp.cremoris*, *Lactococcus lactis* (Kieronczyk *et al.* 2003; Ryan *et al.*, 2001; Kune *et al.*, 2000; Ganesan dan Weimer, 2004, Kieronczyk *et al.* 2003 dan Ryan *et al.*, 2001).

Bakteri asam laktat berperan penting pada industri pengolahan pangan asal susu antara lain mengawetkan dan mempertahankan kualitas secara organoleptik, perkembangan tekstur yogurt, viskositas secara alami, dll. (Cataloluk, 2001; Vuyst dan Vanningelgem *et al.*, 2004).

Hasil metabolit bakteri asam laktat yaitu bakteriosin merupakan zat yang dapat membunuh bakteri dan dapat digunakan untuk usaha pengawetan secara biologik (biopreservasi) pada bahan pangan serta. Bakteri asam laktat dapat sebagai bibit starter unggul serta meningkatkan masa simpan dan keamanan pangan (Sudirman dkk., 1995; Post, 1996; Mullen dan Stilles, 1996; Harijani, 1997). Penggunaan bakteri asam laktat itu sendiri pada produk pangan telah banyak dilakukan yang berperan terhadap flavor, aroma produk fermentasi (Kunne *et al.*, 2000). Bakteriosin dapat digunakan sebagai bahan aditif pada produk pangan untuk mencegah adanya kontaminasi bakteri pembusuk (Cleveland *et al.*, 2001 *didalam* Kemperman *et al.*, 2003). Target sasaran bakteriosin sebagai

antibakteri yaitu permeabilitas membran sel, merusak membran sel sehingga menyebabkan lisis atau bakterilisis (Cuesta *et al.*, 2000).

Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai *food supplement* pada minuman sehat, khususnya produk susu hasil fermentasi antara lain *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacteria spp.*, *Lactobacillus reuteri*.

Proses preservasi dengan pemanfaatan bakteri asam laktat dapat menghasilkan metabolit yaitu asam laktat, asetat, diasetil,  $H_2CO_3$ ,  $H_2O_2$ , bakteriosin dan reuterin (Nettles dan Barefoot, 1993; Liao dan Yousef, 1994; Ray, 1996), yang semuanya merupakan bahan pengawet alami.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat merupakan zat yang mempunyai daya antibakteri terdiri atas polipeptida hasil sintesis sistem ribosom, mempunyai aktivitas terhadap bakteri pembusuk dan bakteri patogen penyebab penyakit serta aktif sebagai fungisida (Cuesta *et al.*, 2000; Leroy dan De Vuyst, 1999; Okkers *et al.*, 1999 dalam Magnusson dan Schnurer, 2001). Penggunaan bakteri asam laktat itu sendiri pada produk pangan telah banyak dilakukan yang berperan terhadap flavor, aroma dan memperpanjang masa simpan produk fermentasi (Kunne *et al.*, 2000)

### 2.3. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang terdiri dari polipeptida sebagai antibakteri yang bersifat bakterisida dan bakteristatik, disintesis oleh sistem ribosom (Kemperman *et al.*, 2003) mempunyai aktivitas terhadap bakteri yang secara ekologi sama dan saling berhubungan erat dalam satu famili (Nettles dan Barefoot, 1993; Cuesta *et al.*, 2000). Bakteriosin dapat digunakan sebagai aditif pada produk pangan untuk mencegah adanya pertumbuhan bakteri pembusuk (Cleveland *et al.*, 2001 dalam Kemperman *et al.*, 2003). Bakteriosin dari kultur *Lactobacillus plantarum* NC8 yaitu plantarucin NC8 atau PLN C8, *Lactobacillus plantarum* diisolasi dari silase rumput (Maldonado *et al.*, 2003). Aplikasi bakteriosin sebagai biopreservasi produk pangan yaitu dapat secara langsung dengan bakteriosin yang berasal dari supernatan kultur strain bakteri asam laktat yang memproduksi (Martinez *et al.*, 2000).

Bakteriosin yang diproduksi bakteri asam laktat dapat diisolasi dari bahan pangan atau produk pangan antara lain susu sapi, susu kambing, usus sapi, yogurt, keju, yakult, daging sapi asap, sosis dan burger sapi (Sudirman dkk. 1995). Penggunaan biopreservatif dengan bakteriosin pada bahan pangan menjadi perhatian khusus karena bakteriosin efektif, tidak merubah rasa, tekstur dan aman terhadap kesehatan konsumen (Gonzales *et al.*, 1993; Ming dan Daeschel, 1993; Muriana dan Kanach, 1995; Holzaptel *et al.*, 1995). Martinez *et al.*, (2000) aplikasi bakteriosin untuk biokontrol bahan pangan dilakukan dengan cara (1) menggunakan isolat BAL yang memproduksi bakteriosin, (2) secara langsung dengan preparat bakteriosin murni.

Saat ini penelitian terus berkembang untuk mengeksplorasi bakteriosin yang diketahui sebagai antibakteri yaitu bakterisid terhadap bakteri patogen penyebab penyakit dan potensial pada pengobatan serta preventif pada penyakit diantaranya kanker, karies gigi (Logos, 2007; Smith *et al.*, 2007).

## METODA PENELITIAN

Sampel diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) yaitu usus sapi potong dalam bentuk segar dan susu segar diperoleh dari Teaching Farm (TF), sampel tersebut langsung dibawa ke Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner dan Lab. diagnostik untuk mengisolasi Bakteri Asam Laktat (BAL). Media yang digunakan adalah Mann Rogosa Sharpe (MRS), *MRS-Broth*, Bacto-Agar, Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Oxoid), NaOH 1N, NaCl fisiologis, akuades steril, alkohol 70%, bakteri indikator *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Lactobacillus plantarum*.

Penelitian dilakukan 2 (dua) tahap yaitu tahap pertama isolasi bakteri asam laktat (BAL), seleksi, karakterisasi BAL, tahap ke dua aplikasi zat antibakteri sebagai biopreservatif bahan pangan asal hewan (Susu).

Alat yang digunakan pada isolasi BAL adalah Beaker glas, tabung reaksi, cawan Petri, tabung Durham, tabung sentrifuge, tabung Erlenmeyer, pipet 1 ml, 5 ml, 10 ml, gelas obyektif, mikroskop, bak plastik, Ose, Automatic Labo-Mixer (Vortex), sentrifuger, rak tabung, mikropipet, tip pipet, inkubator, pH-meter.

Alat dan bahan yang digunakan untuk identifikasi BAL adalah mikroskop, obyektif, Ose, *micro titer plate*, inkubator, sentrifuger, tabung reaksi, *water bath*, PCR System, elektroforesis, komputer untuk analisis, sedangkan bahan yang digunakan meliputi isolat BAL, pewarnaan Gram, minyak emersi, *Primers*, amplifier, Mg Cl<sub>2</sub>, *buffer* lisis, proteinase, agarose, dNTP (larutan stok 20 mM, larutan kerja 10 mM), Taq DNA Polimerase dengan buffer sesuai dengan enzimnya.

### 1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Tahap pertama : Bakteri Asam Laktat (BAL) diisolasi dari usus halus (*intestine*) sapi potong berasal dari rumah potong hewan (RPH) , sampel diperoleh dengan kondisi segar. Media yang digunakan adalah Mann Rogosa Sharpe (MRS). Metode isolasi BAL dilakukan dengan cara metode pengenceran bertingkat.

Alat yang digunakan pada isolasi BAL adalah Beaker glas, tabung reaksi, cawan Petri, tabung Durham, tabung sentrifuge, tabung Erlenmeyer, pipet 1 ml, 5 ml, 10 ml, gelas obyektif, mikroskop, bak plastik, Ose, Automatic Labo-Mixer (Vortex), sentrifuger, rak tabung, mikropipet, tip pipet, inkubator, pH-meter.

Sampel berupa usus halus sapi dipotong-potong, metode yang dilakukan adalah metode pengenceran bertingkat yaitu sampel dipotong menjadi bagian kecil dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan media MRS *broth* kemudian dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Setelah adanya pertumbuhan kemudian dilakukan pengenceran bertingkat  $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ , hasil pengenceran diambil 0,1 ml dengan pipet dimasukkan ke dalam cawan Petri kemudian ditambahkan media MRS Agar pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  dibiarkan memadat, selanjutnya dilapisi (*overlay*) dengan media BHI Agar yang telah diinokulasi bakteri indikator *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*. Setelah media padat kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada media tersebut di atas dan adanya zona hambatan di sekitar koloni pada media lapisan BHI Agar adalah bakteri asam laktat sebagai isolat BAL. yang menghasilkan zat antibakteri. Isolat tersebut selanjutnya dilakukan pengujian lebih lanjut yaitu tahap ke dua seleksi bakteri asam laktat.

## 2. Seleksi Bakteri Asam Laktat

Isolat bakteri asam laktat penghasil zat antibakteri dengan kriteria koloni pada media MRS Agar (Oxoid) lapisan pertama membentuk zona hambatan pada media BHI Agar (Oxoid) lapisan ke dua yang masing-masing mengandung *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*. Isolat diinokulasikan pada media MRS *broth* (Oxoid) dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, selanjutnya disentrifugasi dengan putaran 4000 rpm selama 15 menit untuk memperoleh sel dan supernatan. Kemudian supernatan difiltrasi dengan *milipore* ukuran  $0,2\ \mu\text{m}$  (Sartorius), sedangkan endapan yang mengandung sel ditambahkan MRS *broth* (Oxoid) baru sebagai isolat BAI. disimpan di dalam refrigerator pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dan disimpan di dalam *freezer* pada suhu  $-18^{\circ}\text{C}$ , supernatan selanjutnya dilakukan pengujian untuk seleksi lanjutan yaitu netralisasi dengan NaOH 1N, resistensi panas, resistensi enzim proteolitik, resistensi zat organik, uji aktivitas terhadap bakteri indikator.

### 3. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin

Identifikasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin meliputi morfologi, sifat Gram. Metode yang dilakukan secara mikroskopis, pewarnaan Gram. Tujuan pemeriksaan untuk mengetahui bentuk atau morfologi dan sifat Gram BAL, isolat BAL dengan menggunakan Ose diulas pada obyek gelas kemudian diberi pewarnaan Gram sebagai berikut: preparat diambil dengan Ose diletakan diatas obyek gelas, dikeringkan dan ditetesi *gentian violet* selama 1 menit, selanjunya dicuci dengan aquadest, ditetesi dengan lugol dibiarkan 2 menit, selanjutnya dicuci dengan aseton alkohol, ditetesi safranin dan dicuci aquadest. Selanjutnya dilihat secara mikroskopis dengan pembesaran 100 kali dengan menambahkan minyak emersi

### 4. Karakterisasi Bakteriosin

Bakteri asam laktat yang telah diidentifikasi dan telah dikonfirmasi menghasilkan bakteriosin dan menunjukkan adanya aktivitas, selanjutnya dikarakterisasi yaitu meliputi (1) resistensi terhadap panas, (2) resistensi terhadap enzim trypsin, pepsin, lipase dan (3) uji aktivitas terhadap bakteri indikator.

Bahan yang digunakan adalah supernatan yang mengandung bakteriosin, MRS Agar (Oxoid CM-0359), BHI Agar (Oxoid), NaOH 1N. Bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Streptococcus agalactiae* (Stok isolat Lab. Mikrobiologi FKH IPB), *Escherichia coli* (ITB-CC- B87) dan *Lactobacillus plantarum* (ITB-CC-B125), Bacto Agar (Oxoid), Trypsin 5% (Sigma), Lipase (Sigma), Pepsin (Sigma), Ammonium Sulfat.

Isolat BAL penghasil bakteriosin ditumbuhkan pada MRS *broth* (Oxoid CM-0359) dengan volume 250 ml. Dilakukan inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam (Sudirman dkk. 1995), setelah ada pertumbuhan disentrifugasi dengan 4000 rpm. selama 15 menit, supernatan difiltrasi dengan menggunakan *filter milliphore* berukuran 0,2 µm kemudian supernatan tersebut dibagi menjadi empat bagian untuk dilakukan karakterisasi bakteriosin. Karakterisasi meliputi pengujian terhadap resistensi panas (*Thermoresisten*) yaitu dengan pemanasan pada suhu 80<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit dan 100<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit, diuji terhadap enzim proteolitik yaitu trypsin 5%, pepsin dan lipase dengan konsentrasi akhir 1mg/ml



### Uji Resistensi terhadap Panas (*Thermoresisten*)

Uji resistensi terhadap panas bertujuan untuk mengetahui aktivitas bakteriosin setelah pemanasan 80°C selama 15 menit, 30 menit dan 100°C selama 15 menit, 30 menit.

Bahan yang digunakan adalah supernatan yang mengandung bakteriosin, MRS Agar (Oxoid CM-0359), BHI Agar (Oxoid), NaOH 1N. Bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90).

Supernatan yang mengandung bakteriosin sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam tabung Erlemeyer kemudian setiap tabung dipanaskan di atas penangas air dengan suhu diatur 80°C selama 15 menit, 30 menit dan 100°C selama 15 menit, 30 menit, kemudian diuji aktivitas terhadap bakteri indikator yang telah diinokulasikan ke dalam media BHI Agar (Oxoid) dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/ml. Pengujian aktivitas tersebut dilakukan dengan menggunakan metode sumuran (Sudirman dkk. 1995). Media setelah memadat dibuat lubang sumuran berdiameter 6 mm, kemudian diisi dengan supernatan yang telah dipanaskan sebanyak 50 µl, selanjutnya dilakukan preinkubasi pada suhu 4°C selama 2 jam, dilanjutkan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Medine *et al.*, 2001). Pengamatan dilakukan terhadap ada atau tidak adanya zona hambatan (zona jernih) disekitar lubang sumuran yang menunjukkan resistensi terhadap panas.

### 5.Presipitasi Bakteriosin

Presipitasi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat menggunakan Ammonium Sulfat 20%, 40% dan 60%. Tujuan presipitasi adalah untuk mengendapkan protein bakteriosin yang terlarut di dalam supernatan (Harris dan Angel 1989).

Bahan yang digunakan adalah supernatan yang mengandung bakteriosin, MRS Agar (Oxoid CM-0359), ammonium sulfat 20%, 40% dan 60%. Isolat BAL diambil dengan ose dimasukkan ke dalam media MRS cair (Oxoid CM-0359) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nelsen *et al.*, 2003). Kultur disentrifugasi pada putaran 4000 rpm selama 15 menit, kemudian dipisahkan endapan dan supernatan, supernatan yang mengandung bakteriosin kemudian dipresipitasi dengan menambahkan ammonium sulfat (NH<sub>4</sub> SO<sub>4</sub>) dengan konsentrasi 20%, 40% dan 60% sebanyak 20 ml dan dilakukan pre inkubasi pada suhu 4°C selama 2 jam (Nelsen *et al.*, 2003). Hasil

presipitasi difiltrasi dengan *milipore* ukuran 0,2ml, selanjutnya dimasukkan ke dalam *ependorf* dan sentrifugasi 4000 rpm selama 15 menit sebagai stok bakteriosin.

#### 6. Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B 90)

Bakteriosin sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada media BHI Agar (Oxoid) yang telah diinokulasi *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 2 jam, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam (Harijani, 1997) Diamati ada atau tidak adanya zona hambatan di sekitar lubang sumuran pada media BHI Agar (Oxoid) yang menunjukkan ada atau tidak adanya aktivitas bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B 90).

#### 7. Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap *Escherichia coli* (ITB-CC-B 87)

Bakteriosin sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada media BHI Agar (Oxoid) yang telah diinokulasi *Escherichia coli* (ITB-CC-B87), kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 2 jam, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Diamati ada atau tidak adanya zona hambatan di sekitar sumuran pada media BHI Agar (Oxoid) yang menunjukkan ada atau tidak adanya aktivitas bakteriosin terhadap *Escherichia coli* (ITB-CC-B87).

#### 8. Aplikasi Bakteriosin pada Biopreservasi Susu Pasteurisasi

Aplikasi bakteriosin pada susu pasteurisasi bertujuan untuk mengetahui kualitas susu pasteurisasi secara mikrobiologik berdasarkan penurunan jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi selama penyimpanan di dalam refrigerator.

Bahan yang digunakan meliputi susu pasteurisasi (FKH IPB), media Nutrien Agar (Oxoid), bakteriosin, akuades steril, *methylen blue*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alkohol 70 %.

Sampel berupa susu pasteurisasi sebanyak dua liter dibagi menjadi dua kelompok perlakuan yaitu kelompok satu (I) sebagai kelompok kontrol dan kelompok dua (II) sebagai kelompok perlakuan. Kelompok I tanpa penambahan bakteriosin, kelompok II ditambahkan bakteriosin dengan dosis 200 AU, kelompok sampel tersebut dibagi menjadi 8 bagian terdiri dari 100 mililiter susu pasteurisasi, setiap evaluasi sampel dihitung jumlah total bakteri (*Total Plate Count*) secara *triple* sehingga jumlah sampel 48.

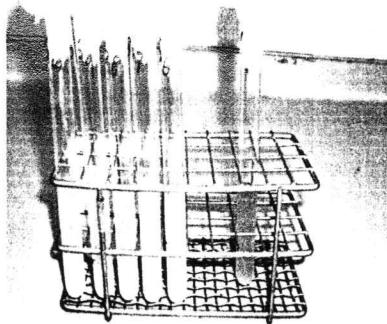
Kelompok sampel dilakukan pemeriksaan awal pada hari ke nol meliputi pemeriksaan kualitas susu pasteurisasi secara mikrobiologis berdasarkan jumlah total bakteri (*Total Plate Count*), pemeriksaan enzimatik meliputi uji reduktase. Kelompok II

disimpan di dalam refrigerator dengan suhu 4<sup>0</sup>C, pemeriksaan kualitas susu pasteurisasi dilakukan pada hari ke 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 selama penyimpanan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

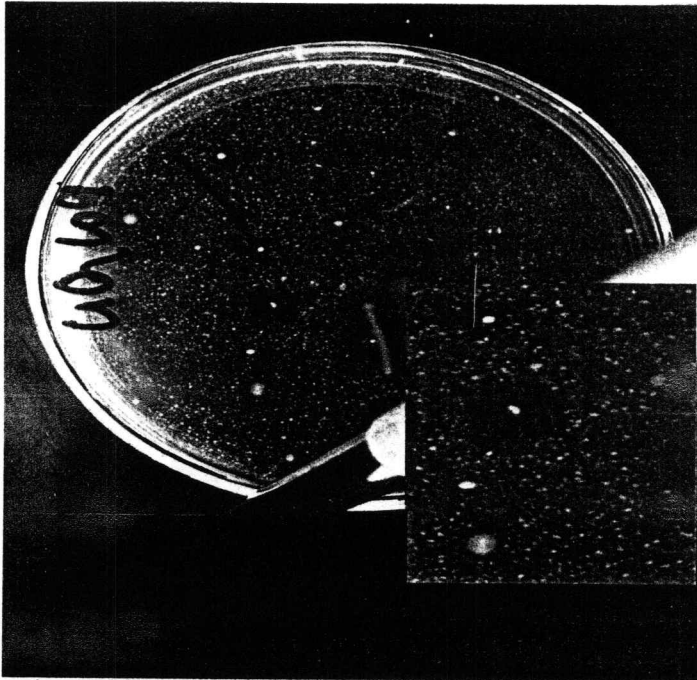
### 1. Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat diperoleh dari hasil isolasi dengan kriteria yaitu warna suspensi isolat putih keruh kekuningan, terdapat gelembung udara atau berbusa serta terdapat endapan warna putih dibagian dasar tabung (Gambar-1).



**Gambar 1. Isolat berasal dari usus sapi potong**

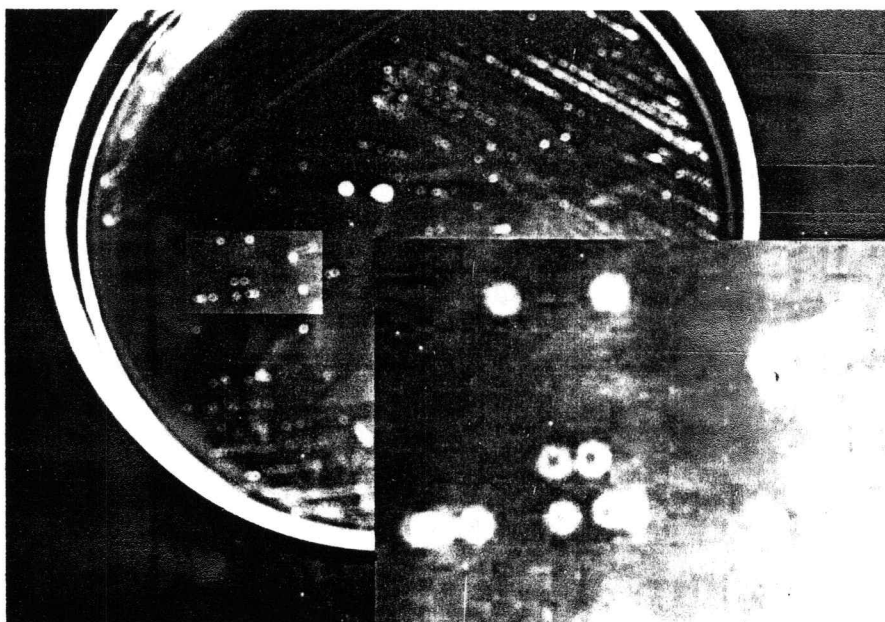
Hasil pemupukan isolat pada media Mann Rogosa Sharpe Agar (MRS Oxoid-CM 0359) yang dilapisi oleh media Brain Heart Infusion Agar (BHI-Oxoid) yang mengandung bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Escherichia coli* (ITB-CC-B8)(Gambar 2).Terlihat adanya pertumbuhan koloni bakteri dengan karakterisasi sebagai berikut: terbentuk zona jernih atau zona hambatan di sekitar koloni, hal ini menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri indikator yang disebabkan karena adanya metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu zat antibakteri. Koloni tersebut adalah bakteri asam laktat (BAL) penghasil zat antibakteri yaitu bakteriosin. Sesuai dengan hasil penelitian Ray (1996) bahwa bakteri asam laktat menghasilkan metabolit yaitu zat antibakteri antara lain asam laktat, asam asetat, diasetil, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reuterin dan bakteriosin.



Gambar 2: Tanda panah menunjukkan zona jernih disekitar koloni BAL penghasil bakteriosin pada media MRS Agar (Oxoid-CM0359) yang dilapisi media BHI-Agar (Oxoid) yang mengandung bakteri indikator

## 2 Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin

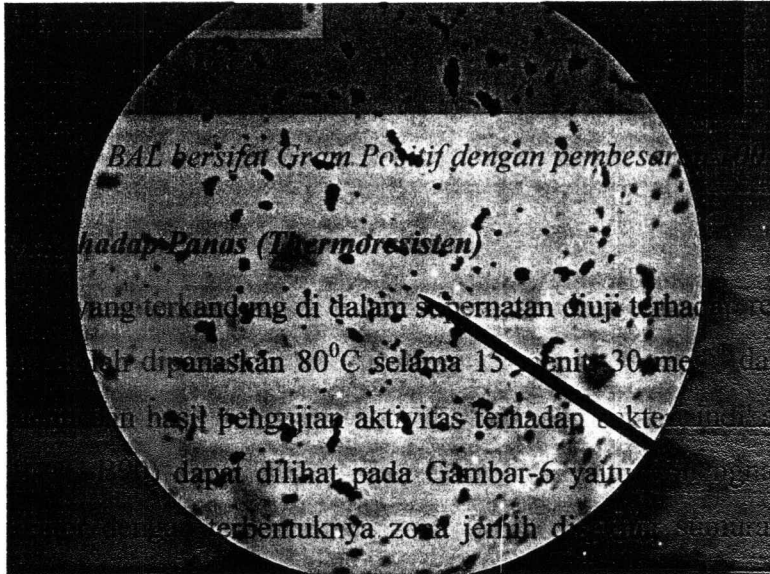
Hasil seleksi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dilakukan terhadap koloni bakteri asam laktat dengan ciri koloni tersebut berbentuk bulat, *opac*, halus (Gambar-3). Hasil seleksi bakteri asam laktat selanjutnya diidentifikasi terhadap morfologi, sifat Gram.



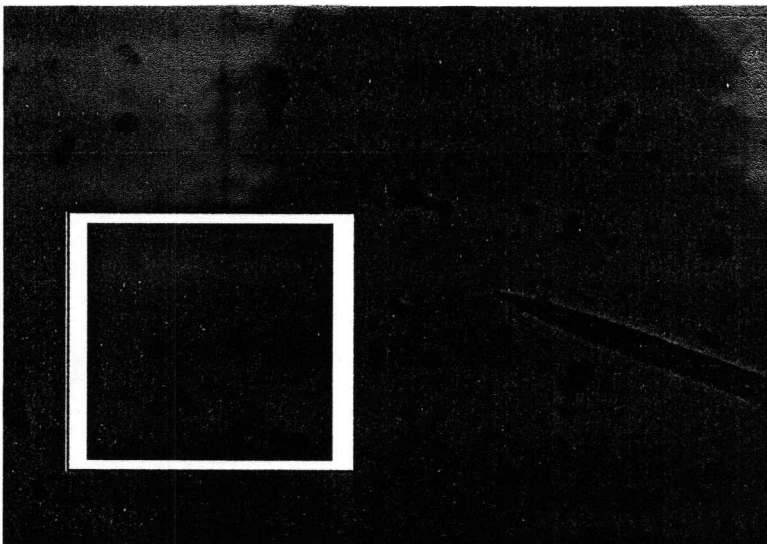
Gambar 3: Koloni Bakteri Asam Laktat Sifat koloni bakteri asam laktat adalah bentuk koloni bulat,*opac*, halus.

### 3. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin

Karakterisasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin meliputi pemeriksaan morfologi, sifat Gram serta uji biokimiawi. Hasil pemeriksaan mikroskopis morfologi bakteri asam laktat terlihat pada Gambar-4 yaitu berbentuk kokus (*Coccus*) atau bulat tidak tersusun berderet tapi terpisah, hasil pemeriksaan sifat Gram dengan pewarnaan Gram terlihat warna merah violet atau keungu-unguan, warna keunguan menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat Gram positif (Gambar-5).



**Gambar 4: Morfologi Bakteri Asam Laktat berbentuk *Coccus***

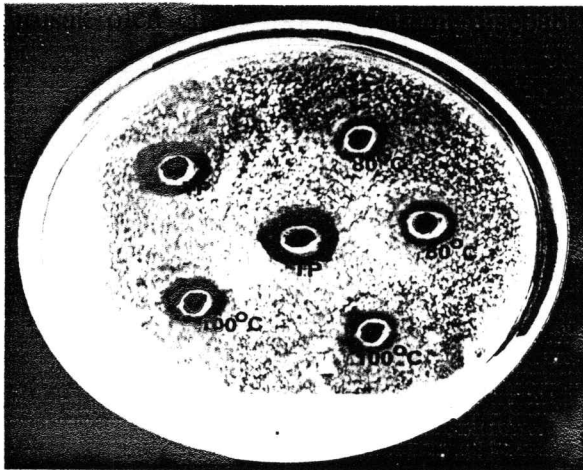


*Gambar 5: BAL bersifat Gram Positif dengan pembesaran 100 x*

#### **4. Resistensi terhadap Panas (*Thermoresisten*)**

Bakteriosin yang terkandung di dalam supernatan diuji terhadap resistensi panas yaitu : supernatan setelah dipanaskan 80<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit dan 100<sup>0</sup>C selama 15 menit, 30 menit dan hasil pengujian aktivitas terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90) dapat dilihat pada Gambar-6 yaitu menghambat pertumbuhan bakteri indikator dengan terbentuknya zona jernih disekitar sumuran pada media BHI

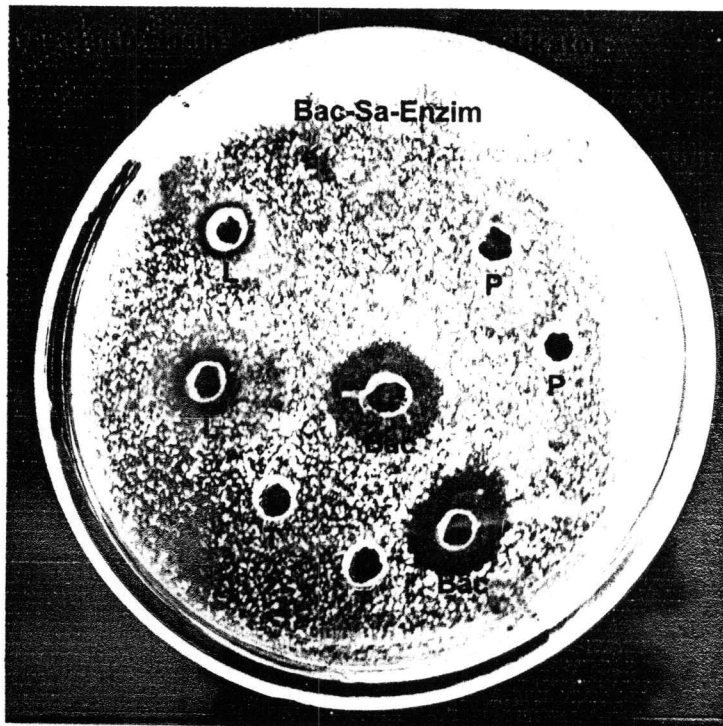
Agar (Oxoid). Hal ini membuktikan bahwa bakteriosin resisten terhadap panas pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, 30 menit dan  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, 30 menit. Hal ini disebabkan karena stabilitas resistensi terhadap panas dipengaruhi oleh keberadaan komformasi reseptor protein dari asam amino yang terkandung di dalam bakteriosin, semakin kecil asam amino yang terkandung di dalam bakteriosin atau berat molekul protein bakterison kecil maka bakteriosin tersebut stabil terhadap panas (Lyon dan Glatz, 1993 *dalam* Leversee dan Glatz, 2001). Menurut Sudirman dkk. (1995) bahwa zat aktif bakteriosin yang diproduksi BAL tetap stabil pada pemanasan  $100^{\circ}\text{C}$ -30 menit



**Gambar 6. Uji Aktivitas bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Variasi Suhu Pemanasan  $80^{\circ}\text{C}$  dan  $100^{\circ}\text{C}$ . TP : Tanpa panas, Bac-Sa-Panas (Bakteriosin-*Staphylococcus aureus*-Panas).**

### 5. Resistensi Bakteriosin terhadap Enzim

Hasil pengujian aktivitas bakteriosin setelah penambahan enzim trypsin 5% (Sigma), Pepsin (Sigma), adalah tidak aktif terhadap *Staphylococcus aureus*, hal ini dapat dilihat pada Gambar-7, sedangkan uji resistensi terhadap enzim lipase masih menunjukkan adanya aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteriosin diinaktivasi oleh enzim trypsin (5%) dan pepsin (sigma). Seiring dengan pendapat Kempermen *et al.*, (2003), bahwa molekul protein bakteriosin diinaktivasi oleh enzim proteolitik. Sedangkan uji enzimatik dengan lipase tidak mampu melakukan inaktivasi bakteriosin, karena bakteriosin adalah polipeptida yang tidak dapat dirusak oleh enzim lipase, hal ini disebabkan karena lipase bekerja pada lemak.



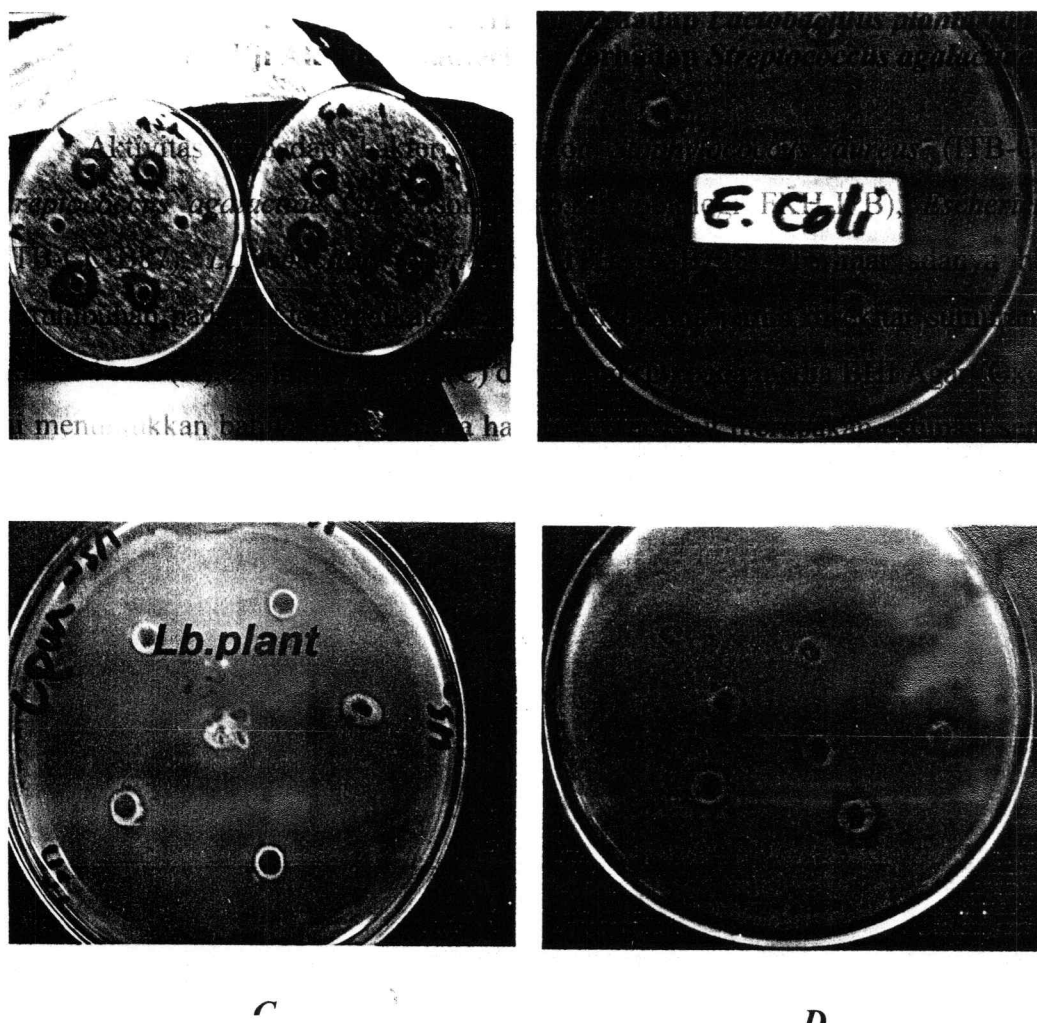
**Gambar 7. Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Penambahan Enzim Trypsin (T), Pepsin (P) dan Lipase(L).**

Bakteriosin adalah molekul protein maka secara kerja enzimatis bakteriosin ini akan dihambat oleh enzim proteolitik, artinya bakteriosin ini akan dihidrolisis oleh enzim, terutama trypsin dan pepsin yang merupakan enzim proteolitik (Kempermen *et al.*, 2003). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa bakteriosin ditambahkan dengan tripsin maupun pepsin, maka tidak terjadi zona hambatan, sebagai kontrol hanya dipakai bakteriosin yang menghasilkan zona hambat terbesar. (Gambar 8).

#### **6.Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap Bakteri Indikator**

Hasil uji aktivitas bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae* dapat dilihat pada Gambar-8 (A,B,C,D)





**Gambar 8: Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap Bakteri indikator**

- A. Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*
- B. Uji Aktivitas bakteriosin terhadap *Escherichia coli*
- C. Uji Aktivitas bakteriosin terhadap *Lactobacillus plantarum*
- D. Uji Aktivitas bakteriosin terhadap *Streptococcus agalactiae*

Aktivitas terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Streptococcus agalactiae* (stok isolat Lab.Mikrobiologi FKH-IPB), *Escherichia coli* (ITB-CC-B87), *Lactobacillus plantarum* (ITB-CC-B125). Terlihat adanya hambatan pertumbuhan pada bakteri indikator yaitu adanya zona jernih disekitar sumuran dengan ukuran 4 mm (A), 2 mm (B), 2 mm(C) dan 2 mm (D) pada media BHI Agar (Oxoid). Hal ini menunjukkan bahwa ukuran zona hambatan tersebut merupakan estimasi sensitivitas aktivitas bakteriosin (Paik dan Glatz, 1997), bakteriosin yang terkandung di dalam

supernatan merupakan hasil metabolit *Pediococcus pentosaceus* yaitu sebagai antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri antara lain *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Streptococcus agalactiae* (stok isolat Lab. Mikrobiologi FKH-IPB), *Escherichia coli* (ITB-CC-B-87) dan *Lactobacillus plantarum* (ITB-CC-B125).

## 7. Pengaruh Bakteriosin terhadap Penurunan Jumlah Bakteri pada Susu

### Pasteurisasi

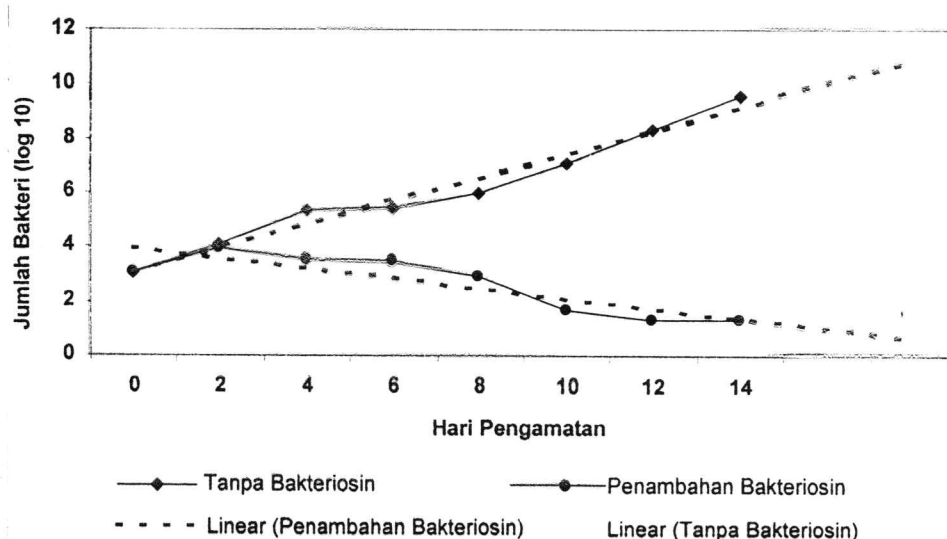
Hasil pengamatan jumlah rata-rata bakteri/TPC pada hari kedua, hari keempat dan seterusnya sampai hari ke-14 dengan menggunakan 3 kali ulangan pada setiap hari pengamatan dijabarkan pada Tabel-2.

**Tabel 2. Rataan Jumlah Bakteri / TPC Susu Pasteurisasi tanpa Bakteriosin dan dengan Penambahan Bakteriosin.**

Hari Pengamatan	Tanpa Bakteriosin		Penambahan Bakteriosin	
	Jumlah	Logaritma	Jumlah	Logaritma
0	1205	3,0810	1205	3,0810
2	12150	4,0846	8250	3,9165
4	203000	5,3075	3250	3,5119
6	244000	5,3874	2700	3,4314
8	1050000	6,0212	800	2,9031
10	12300000	7,0899	50	1,6990
12	234000000	8,3692	20	1,3010
14	3700000000	9,5682	20	1,3010

Tabel-2 memperlihatkan bahwa rata-rata jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi tanpa penambahan bakteriosin terus mengalami peningkatan selama periode evaluasi, sampai hari ke-14 (empat belas) mencapai  $37 \times 10^8$  cfu/ml. Sebaliknya pada susu pasteurisasi dengan penambahan bakteriosin, rata-rata jumlah total bakteri terus mengalami penurunan mulai hari ke-4 (empat) yaitu dari  $32,50 \times 10^2$  cfu/ml sampai hari ke-14 yaitu  $2 \times 10^1$  cfu/ml. Walaupun pada hari kedua terjadi peningkatan jumlah total bakteri ( $82,50 \times 10^2$  cfu/ml), tetapi rata-rata jumlah total bakteri pada hari kedua masih cukup baik dan masih memenuhi syarat mutu susu pasteurisasi yaitu jumlah total bakteri (TPC) maksimal  $3 \times 10^4$  cfu/ml (SNI 2003). Secara visual jumlah total

bakteri dalam susu pasteurisasi tanpa bakteriosin dan dengan penambahan bakteriosin dapat dilihat pada Gambar berikut ini.



**Gambar 9. Pengaruh Bakteriosin terhadap jumlah bakteri pada susu pasteurisasi**

Gambar-9 menunjukkan bahwa pertumbuhan jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi yang tidak ditambahkan bakteriosin melaju dengan cepat seiring dengan bertambahnya waktu. Sebaliknya jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi yang ditambahkan bakteriosin terjadi penurunan jumlah total bakteri seiring dengan bertambahnya waktu. Garis putus pada Gambar-14 merupakan garis *trend linier* jumlah total bakteri berdasarkan hari pengamatan pada susu pasteurisasi.

Berdasarkan hasil pengolahan data pada Tabel-2 menggunakan regresi linier diperoleh model laju pertumbuhan jumlah bakteri pada kedua jenis perlakuan sebagai berikut:

$$Y_1 (\text{tanpa bakteriosin}) = 3,0797 + 0,4334 t^*$$

$$Y_2 (\text{dengan bakteriosin}) = 3,9558 - 0,1875 t^*$$

Keterangan :

Y : Jumlah bakteri

t : Hari pengamatan

\* signifikan pada level 1%

Model regresi linier menunjukkan bahwa jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi tanpa bakteriosin memiliki kepekaan (elastisitas) sebesar 0,4334, artinya setiap hari jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi tanpa penambahan bakteriosin diproyeksikan akan mengalami peningkatan sebesar 43,34% dari hari sebelumnya. Sedangkan jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi dengan penambahan bakteriosin memiliki kepekaan (elastisitas) sebesar -0,1875, artinya setiap hari jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi dengan penambahan bakteriosin diproyeksikan akan mengalami penurunan sebesar 18,75% dari hari sebelumnya.

Kedua model tersebut di atas signifikan pada level 1% maka berdasarkan hasil penelitian penyimpanan susu pasteurisasi pada suhu 4<sup>0</sup> C selama 14 hari dapat disimpulkan bahwa penambahan bakteriosin dapat mengurangi jumlah total bakteri susu pasteurisasi. Hal ini menunjukkan bahwa adanya aktifitas bakteriosin terhadap bakteri di dalam susu pasteurisasi bersifat bakterisid sehingga dapat mempertahankan kualitas susu pasteurisasi berdasarkan jumlah total bakteri.

Lebih lanjut untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan rata-rata jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi tanpa penambahan bakteriosin dengan yang ditambahkan bakteriosin dilakukan uji perbandingan. Hasil yang diperoleh dari perbandingan rata-rata jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi antara kelompok kontrol (tanpa bakteriosin) dengan kelompok perlakuan (ditambah bakteriosin) dapat dilihat pada Tabel-3.



**Tabel 3. Hasil Perbandingan Rataan Jumlah Total Bakteri / TPC (Log) Susu Pasteurisasi Tanpa Bakteriosin dan dengan Penambahan Bakteriosin**

masa simpan susu. Kelompok	n	Rataan Jumlah Bakteri (Log)	t <sub>hitung</sub>	P- Valu e	Keterangan
Kontrol	8	6,1136	3,154	0,016	Berbeda nyata
Perlakuan	8	2,6431			

Hasil pengujian statistik (t-test) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada rataannya jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan oleh hasil pengujian dimana nilai t<sub>hitung</sub> (3,154) > t<sub>tabel</sub> (2,365) atau juga dapat dilihat dari *p-value* (0,016) yang masih lebih kecil dari 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ).

Berdasarkan hasil pengujian dapat dibuktikan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada rataannya jumlah total bakteri antara susu pasteurisasi tanpa bakteriosin dan dengan penambahan bakteriosin. Selama 14 hari pengamatan rataannya jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi yang tidak ditambahkan bakteriosin sebesar  $37 \times 10^8$  cfu/ml dan rataannya jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi yang ditambahkan bakteriosin sebesar  $10^2$  cfu/ml. Berdasarkan hasil pengujian tersebut di atas membuktikan bahwa bakteriosin sebagai antibakteri mampu menurunkan jumlah total bakteri pada susu pasteurisasi sampai hari ke-14. Hasil pengujian ini sesuai dengan hasil penelitian Wirjantoro *et al.* (2000) bahwa bakteriosin (nisin) sangat efektif sebagai kontrol bakteri pada susu, mempertahankan kualitas dan memperpanjang masa simpan susu.

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

### **KESIMPULAN :**

1. Bakteriosin yang dihasilkan Bakteri Asam Laktat potensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (ITB-CC-B90), *Escherichia coli* (ITB-CC-B87),
2. Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat berperan sebagai biopreservasi bahan pangan asal hewan (susu pasteurisasi).

### **SARAN**

Bakteriosin sebagai anti bakteri yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat digunakan pada biopreservasi bahan pangan asal hewan susu pasteurisasi

## DAFTAR PUSTAKA

- Benkerroum, N., H. Oubel, and L.B. Mimoun. 2002. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Yogurt Fermented with a Bacteriocin-Producing Thermophilic Starter. *Journal of Food Protection*. 65: No. 5, p. 799-805
- Beesley, JE (eds), 1995. Immunocytochemistry. IRL Press New York.
- Cataloluk, O. 2001. Molecular Characterization of the Gene Encoding for the Salivaricin B Activity and its Flanking Sequences. *Turk J.Biol.* 25: 378-386.
- Coconnier M.H., V. Lievin, E. Hemery and A.L. Servin. 1998. Antagonistic Activity against Helicobacter Infection *In-Vitro* and *In-Vivo* by The Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Appl. and Environmental Microbiology*. 64: no. 11. p. 4573-4580
- Cuesta, M.C.M., J.Kok, E. Herranz., C. Pelaez., T. Requena, and G. Buist. 2000. Requirement of Autolytic Activity for Bacteriocin-Induced Lysis. *Appl. And Environmental Microb.* Aug.p.3174-79.
- De-Martinez., Y.B.,K. Ferrer, and E.M. Salas. 2002. Combined Effect of Lactic Acid and nisin Solution in Reducing Levels of Microbiological Contamination in Red Meat Carcasses. *Journal of Food Protection*. 65: No. 11.p.1780-83.
- Fantinanto, V.,A.O.C. Joger, M.T. Shimizu. 1999. Production of Bacteriocin Like Inhibitory Substances (BLIS) by *Streptococcus salivarius* Strain Isolate from the Tongue and Throat of Children with and without Sore Throat. *Revisa de Microb.* 30 : 332-34.
- Fuller, R. 1992. Probiotics, The Scientific Basic. Champman and Hall. London.
- Ganesan B. and B.C. Weimer. 2004 Role of Aminotransferase Ilve in Production of Branched- Chain Fatty Acid by *Lactobacillus lactic* subsp *lactis*. *Appl and Environmental Microbiology*. Jan.p.638-641.
- Garneau S., C.A.Ference, M.J. Van Belkum, M.E. Stiles, and J.C.Vederas. 2003. Purification and Characterization of Brochocin A and Brochocin B (10-43),a functional Fragment Generated by Heterogous Expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl. and Environmental Microbiology*. Mar.p.1352-1358.
- Garver, K., and P.M. Muriana. 1993 Detection, Identiocation and Characterization Producing Lactic Acid Bacteria from Retail Product. *International Journal of Food Microbiology*. 19 : 241-58.

- Gonzales, S.N., M.C. Apella, N.C. Romero, M.E.N. de Macias and G. Oliver, 1993. Inhibition of Enteropathogen by *Lactobacillus* Strain used in Fermented Milk. *Journal of Food Protection*. 56 : 773-76.
- Gonzales, F.D. 2007. Use of Bacteriocins in Livestock. <http://www.horizonpress.com/hsp/abs/absbact.html>
- Harijani, N., 1997. Pengaruh Bakteriosin sebagai Biopreservasi pada Daging Segar dalam Kemasan dan Profil Aktivitas Antibakterial. Tesis. Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Hanlin, M.B., N. Kalchayanand, P. Ray., B. Ray. 1993. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria in Combination have Greater Anti-bacterial Activity. *Food Protection*. 56 (3): 525-55.
- Holzappel, W.H., R. Giesen, U. Schillinger. 1995. Biological Preservation of Food with Reference to Protective Cultures, Bacteriocin and Food Grade Enzymes *International Journal of Food Microbiology*. 24: 343-62.
- Holzappel, W.H., P. Haberer, R. Giesen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganism in Food and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: no. 2, 365s-373s.
- Kempermen R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers and J. Kok. 2003. Identification and Characterization of two Novel Clostridial Bacteriocins, Circularin A and Closticin 574. *Appl. and Environmental Microbiology* Mar.p.1589-1597.
- Krier F., A.M.Revol-Junelles, P. Germain. 1998 Influence of Temperature and pH on Production of Two Bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch Fermentation. *Appl. Microbiology Biotechnol* 50 : 359-363.
- Kunne, N.F., I. Geoganaras, A. Van Holy, and J. W. Hastings. 2000. Characterization and Determination of Origin of Lactic acid Bacteria from a Sorghum-based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Finger Printing. *Appl. and Environmental Microb.* Mar.p.1084-92.
- Lagos R. 2007. Cytotoxic Activity of Bacteriocins Against Eucaryotic Cells. <http://www.horizonpress.com/hsp/abs/absbact.html>
- Leroy, F., and L. De-Vuyst. 1999. the Presence of Salt and Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sage Fermentation. *Appl. and Environmental Microb.* Dec.p.5350-56.
- Liao, C.C., A.E. Yousef, G.W. Chism and E.R. Richter. 1999. Inhibition



of *Staphylococcus aureus* in Buffer, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU 133. *Journal of Food Safety* 4:87-101.

- Magnusson, J., and J. Schnurer. 2001. *Lactobacillus corynoformis* subsp. *coryniformis* Strain Si-3 Produces Broad Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. and Environmental Microbiology*. Jan.p.1-5.
- Martinez, J.M., J. Kok., J.W. Sanders, and P.E. Hernandez. 2000. Heterologues Coproduction of Enterocin A and Pediocin PA-1 by *Lactobacillus lactis* : Detection by Specific Peptide-Directed Antibodies. *Appl. and Environmental Microbiology*. Aug. p. 3543-49.
- Medine, R., M. Katz., S. Gonzales, and G. Oliver. 2001. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from North West Argentina. *Journal of Food Protection* Vol. No. 4.p. 559-63.
- Mc. Mullen, L.M.,M.E. Stiles. 1996. Potential for Use of Bacteriocin Producing Lactic acid Bacteria in the Preservation of Meats. *Journal of Food Protection*.p. 64-71.
- Ming, X., M.A. Daeschel. 1993. Nisin Resistance of Food Born Bacteria and The Specific Resistance Responses of *Listeria monocytogens* Scott A. *Journal of Food Protection*. 56 (11): 944-48.
- Muriana, P.M., and Kanach. 1995. use of Nisaplin to Inhibit Spoilage Bacteria in Buttermilk Ranch dressing. *Journal of Food Protection*. P. 58 (10): 1109-13.
- Muriana, P.M.1996. Bacteriocin for Control of *Listeria sp.*In Food.*Journal of Food Protection*. p. 54-63
- Nettles C. G., and S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and Lactic Acid Bacteria. In Food. *Journal of Food Protection*. p. 56: 338-56.
- Nilsen T., I.F.Nes and H.Holo. 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG. 2333. *Appl. and Environmental Microbiology* May.p.2975-2984.
- Neu T. and. B. Hendrich. 2003. New Thermo sensitive Delivery Vector and Its Use to Enable Nisin-Controlled Gene Expression in *Lactobacillus gassier*. *Appl. and Environmental Microbiology*. Mar. p. 1377-1382.
- Paik. H.D., and B.A.Glatz. 1997. Enhanced Bacteriocin Production by *Propionic bacterium thoenic* in Fed-Batch Fermentation *Journal of Food protection* 60:No.12.p.1529-1533.
- Pestka, J.J., C.L. Ha, R.W. Warner, J.H. Lee, and Z. Ustunal. 2001. Effect of Ingestion of Yogurt Containing *Bifidobacterium* and *Lb, acidophilus* on Spleen and Payer's

- Patch Lymphocyte Population in The Mouse. *Journal of Food Protection*. 64:No. 3 p. 391-95.
- Post, R.C., 1996. Regulatory Perspective of the USDA on the Use on Antibacterium and Inhibitors in Foods. *Journal Protection*.p.79-81.
- Rahayu, E.S. 1997. Biopreservasi dan Probiotik dalam Industri Pangan. BAL sebagai Penghasil Agensia Antimikrobia. Seminar. Yogyakarta. Juni.
- Ray, B. 1992. Nisin of *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* as a Food Biopreservative. *Food Biopreservative of Microbia*. Origin. Chapter 9. RCR. Press. London.
- \_\_\_\_\_. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. Washington CRC-Press.
- \_\_\_\_\_. 1996. *Lactic Acid Bacteria : Current Advances in Methabolism. Genetics, and Application*. Published by : Springer verlag. German.
- Smith J.L.,R.S.Orugunty and J.D.Hillman. 2007. Lantibiotic Production by *Streptococcus mutans*: Their Uses in Replacement Therapy Prevention of Dental Caries and as Antibiotics for the Treatment of Various Infectious. <http://www.horizonpress.com/hsp/abs/absbact.html>.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). 2003. Standar Mutu Produk Susu dan olahannya berdasarkan Standar Nasional Indonesia. Direktorat Pengolahan dan Pemasaran Hasil Perternakan. Direktorat Jenderal Bina Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian. Departemen Pertanian.
- Steel, G.D.,J.D. Torrie. 1993 *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Sudirman, I., E.A. Siregar, R Na'im. 1995. Pemanfaatan BAL Penghasil Bakteriosin sebagai Bibit Starter Unggul dan Biopreservasi pada makanan. Laporan Penelitian. Hibah Bersaing IV. Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 1995/1996. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Sudirman, I. 1996. Prospek Biopreservasi dalam Industri Susu. KURSUS Singkatan Jaminan Mutu dalam Industri Susu. Seminar Fakultas Kedokteran Hewan. IPB.Bogor.
- Vaningelgem.F.,M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany.M. Vancanneyt.J. Swings and L. De-Vuyst. 2004. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* strains is Reflected in their Protection and their Molecular and Funtional Characteristics. *Appl. and Environmental Microbiology*. Feb. p. 900-912.

- Varnan A. 2002. *Lactobacillus* : Occurrencee and Significance in non-dairy Foods. Microbiology today. Feb.Vol.29.
- Winkowski, K., and T.J. Montville. 1992. Use of Meat isolat *Lactobacillus bavaricas* to Inhibit *Listeria monocytogenes* Growth in a Model Meat Gravy System. Journal of Food Safety. 13 : 19-31.
- Wirjantoro, T.I., M.J. Lewis, A.S. Gradison, G.C. Williams, and J. Delves. Broughtons. 2001. The Effect of Nisin on the Keeping Quality of Reduced Heat. Treated Milks. Journal of Food Protection. 64: No. 2, p. 213-19.