

**PENGARUH KEJUT MEDAN LISTRIK TERHADAP  
PENURUNAN JUMLAH DAN PROFIL PITA  
PROTEIN *Escherichia coli***

**TUGAS AKHIR**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Oleh:  
**SENJA PUSPITA AYU**  
0310910053-91



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2008**



**LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR**  
**PENGARUH KEJUT MEDAN LISTRIK**  
**TERHADAP PENURUNAN JUMLAH DAN**  
**PROFIL PITA PROTEIN *Escherichia coli***

Oleh:  
**SENJA PUSPITA AYU**  
**0310910053-91**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 13 Februari 2008  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

**Pembimbing I**

**Dra. Tri Ardyati, M.Agr.Sc.,PhD**  
**NIP. 131 960 437**

**Pembimbing II**

**Dr. Ir. Purwadi, MS**  
**NIP. 131 653 127**

**Mengetahui,**  
**Ketua Jurusan Biologi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**DR. Agung Pramana Warih M., M.Si.**  
**NIP. 131 970 480**

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Senja Puspita Ayu  
NIM : 0310910053-91  
Jurusan : Biologi  
Penulis Tugas Akhir berjudul : Pengaruh Kejut Medan Listrik  
Tehadap Penurunan Jumlah dan Profil Pita Protein *Escherichia coli*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari Tugas Akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Tugas Akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata Tugas Akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Februari 2008

Yang menyatakan,

Senja Puspita Ayu  
NIM. 0310910053-91

## PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR

Tugas Akhir ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipnya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



## PENGARUH KEJUT MEDAN LISTRIK TERHADAP PENURUNAN JUMLAH DAN PROFIL PITA PROTEIN *Escherichia coli*

### ABSTRAK

*Escherichia coli* merupakan flora normal saluran pencernaan manusia dan hewan. Selain sebagai flora normal, pada kondisi tertentu *E. coli* dapat mengkontaminasi bahan makanan sehingga menyebabkan penyakit dan infeksi pada manusia. Perlakuan kejut medan listrik sebagai salah satu metode pengawetan untuk mencegah kehilangan nutrisi dan dapat mengurangi jumlah *E. coli*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kejut medan listrik terhadap penurunan jumlah serta pengaruhnya terhadap profil pita protein bakteri *E. coli*. Media LB Broth dan susu skim 5% diinokulasi dengan bakteri *E. coli* jumlah sel awal  $\pm 10^9$  cfu/ml digunakan sebagai kontrol yaitu tanpa perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm (0 menit) dan diperlakukan dengan kejutan listrik selama 4, 5, dan 6 menit. Setelah perlakuan, dilakukan perhitungan jumlah bakteri *E. coli* dengan metode *pour plate* untuk mendapatkan angka *Total Plate Count* (TPC) menggunakan media selektif *MacConkey Agar*. Analisa profil pita protein *E. coli* dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan kejut medan listrik meliputi ekstraksi protein total seluler bakteri, penyetaraan kadar protein dengan metode biuret sehingga diperoleh kadar protein yang digunakan adalah 0,036 mg/ml, kemudian sampel protein dipisahkan dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian ini menunjukkan rerata jumlah *E. coli* pada media LB Broth dan susu skim 5% mengalami penurunan yaitu dari  $2,42 \times 10^9$  cfu/ml menjadi  $2,15 \times 10^5$  cfu/ml untuk LB Broth dan  $2,15 \times 10^9$  cfu/ml menjadi  $2,00 \times 10^6$  cfu/ml untuk susu skim 5%. Penurunan jumlah *E. coli* semakin besar dengan semakin lama kejutan yang diberikan, terjadi perubahan pada profil pita protein yaitu semakin tipis.

**Kata kunci :** kejut medan listrik, *Escherichia coli*, SDS-PAGE

## THE EFFECT OF PULSED ELECTRIC FIELDS ON REDUCING THE NUMBER OF *Escherichia coli* AND ITS PROTEIN PROFILE

### ABSTRACT

*Escherichia coli* is a normal inhabitant of the intestines of human and animals. In some cases, *E. coli* can contaminated food, caused infection and human illness. *Pulsed electric fields* (PEF) is a nonthermal method for foods preservation to prevent nutrition loss and to reduce the number of *E. coli*. The purposes of this study were to observe the influence of PEF to kill *E. coli* and their protein profile *E. coli*. LB Broth and 5% skim milk medium were inoculated with *E. coli* at number approximately  $10^9$  cfu/ml. Control was the medium containing the same amount of *E. coli* without treated with PEF. Treatment of PEF were performed for each medium containing *E. coli* for 4, 5, and 6 minute. Number of cell was determined by *Total Plate Count* (TPC) with *pour plate* methods using selective medium, *MacConkey Agar*. Protein profile of *E. coli* was analyzed before (control) and after PEF treatment. Preparations involved were total cellular protein extraction, equalizer the concentration protein using Biuret methods, and separation of protein samples by SDS-PAGE. *Pulsed Electric Field* 2,4 kV/cm resulted reduction number of *E. coli* from  $2,42 \times 10^9$  cfu/ml to  $2,15 \times 10^5$  cfu/ml for LB Broth and  $2,15 \times 10^9$  cfu/ml to  $2,00 \times 10^6$  cfu/ml for 5% skim milk. The inactivation of *E. coli* increased with increasing period of PEF treatment. The protein concentration applied for SDS-PAGE was 0,036 mg/ml result the protein profile of *Escherichia coli* became more thin.

**Key words** : pulsed electric field, *Escherichia coli*, SDS-PAGE

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayahNya sehingga Tugas Akhir yang berjudul “ Pengaruh Kejut Medan Listrik Terhadap Penurunan Jumlah dan Profil Pita Protein *Escherichia coli*” sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi dapat diselesaikan.

Tugas Akhir ini tidak dapat diselesaikan tanpa adanya bantuan dari banyak pihak, untuk itu diucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ibu Tri Ardyati, M.Agr.Sc., PhD selaku Pembimbing I atas perhatian, saran-saran, dan bimbingannya.
2. Bapak Dr. Ir. Purwadi, MS selaku Pembimbing II atas perhatian, saran-saran, dan bimbingannya.
3. Ibu Dr. Sri Rahayu, MS, Dr. Sri Widyarti, MSi, dan Dra. Anna Rosdiana, M.App.Sc selaku dosen penguji atas saran dan ide-idenya.
4. Ibu Catur yang pernah meluangkan waktu menjadi Pembimbing Akademik dan memberikan masukan yang sangat bermanfaat..
5. Mbak Nanik, Mbak Anik, Mas Sofy, dan Anak-anak Mikro 2003 atas semua bantuannya.
6. Ayah, Mama, Adek, Om yang senantiasa memberikan doa, dukungan, motivasi, dan bantuannya.
7. Semua teman-temanku untuk motivasi dan bantuannya selama ini.

Penulis menyadari bahwa tiada gading yang tak retak, oleh karena diharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan karya selanjutnya.

Malang, Februari 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN TUGAS AKHIR</b> .....	iv
<b>ABSTRAK/ABSTRACT</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Susu .....	4
2.1.1 Susu Sapi .....	4
2.1.2 Susu Skim .....	5
2.2 Bakteri-Bakteri Patogen dalam Susu .....	5
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3.1 Habitat dan Ciri <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3.2 Patogenitas <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3.3 Protein <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.4 Metode Pengawetan Susu .....	8
2.4.1 Pasteurisasi Susu .....	8
2.4.2 Kejut Medan Listrik.....	9
2.4.2.1 Klasifikasi Proses Kejut Listrik Berdasar Aliran Bahan.....	10
2.4.2.2 Mekanisme Inaktivasi Mikroba.....	11
2.4.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Inaktivasi Mikroba.....	13
2.4.2.4 Penelitian yang Berhubungan dengan Kejut Medan Listrik .....	15



**BAB III METODE PENELITIAN**

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....19  
 3.2 Rancangan Penelitian .....19  
 3.3 Pelaksanaan Penelitian. ....20  
 3.4 Perhitungan Jumlah Bakteri *Escherichia coli*.....21  
 3.5 Analisis Profil Pita Protein *Escherichia coli*.....22  
     3.5.1 Preparasi Bakteri .....22  
     3.5.2 Ekstraksi Protein Seluler Total Sel Bakteri .....22  
     3.5.3 Analisis Pola Pita Protein dengan SDS-PAGE .....22  
 3.6 Analisis Data .....24

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Penurunan Jumlah *Escherichia coli*.....25  
 4.2 Profil Pita Protein *Escherichia coli* Sebelum dan Sesudah  
     Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....29

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....33  
 5.2 Saran.....33

**DAFTAR PUSTAKA** .....34

**LAMPIRAN** .....39



## DAFTAR GAMBAR

Gambar

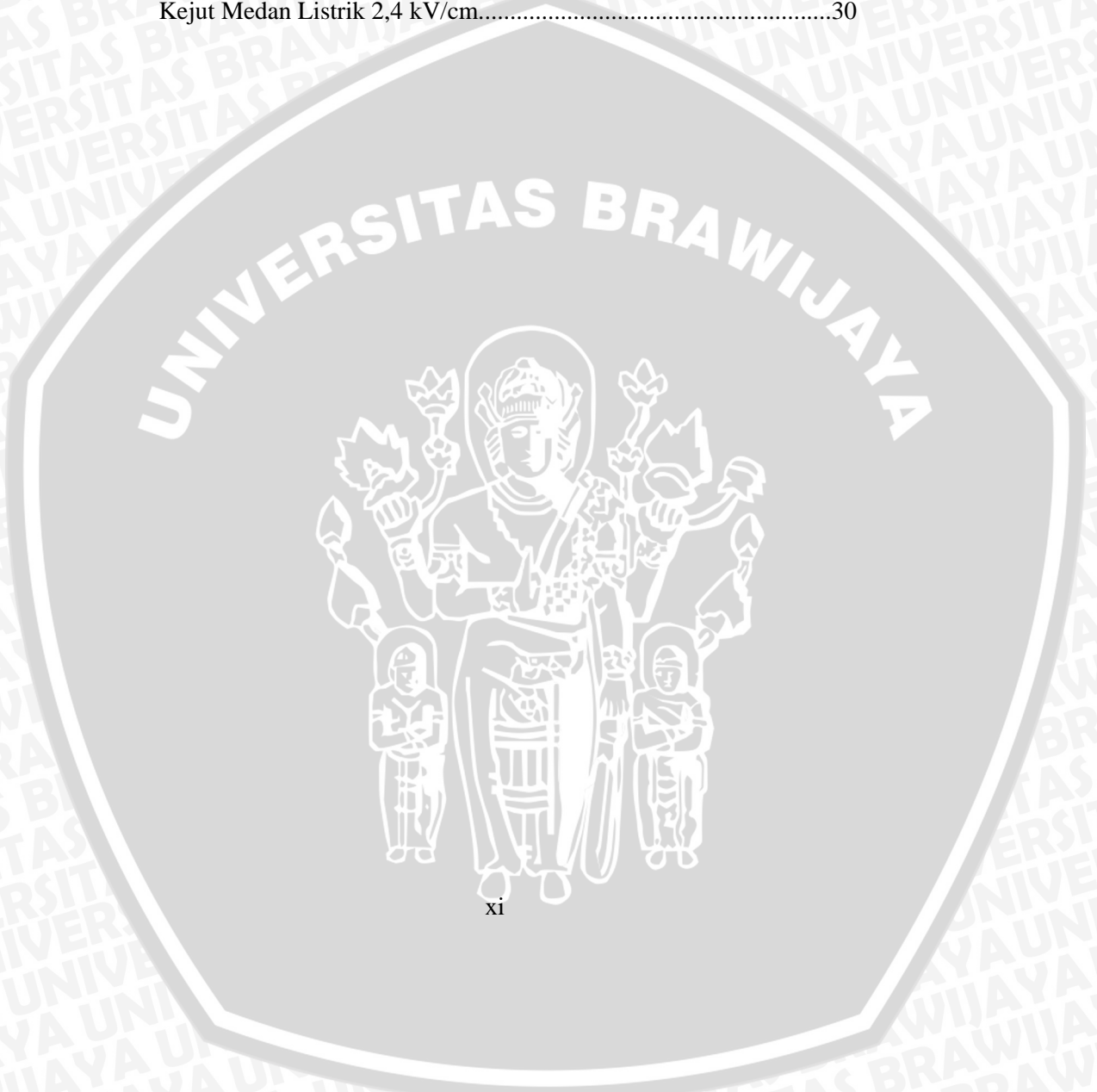
1. Proses Kejut Medan Listrik Secara Kontinyu.....11
2. Skema Perusakan Membran Mikroba Akibat Kejut Listrik.....11
3. Elektroforasi Membran Sel.....12
4. Pengaruh SDS Terhadap Struktur Protein.....18
5. Hasil Analisis Ragam (Anova) Terhadap Rerata Logaritma Jumlah *E. coli* Akibat Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....26
6. Pola Pita Protein *Escherichia coli* Sebelum dan Sesudah Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....29



DAFTAR TABEL

Tabel

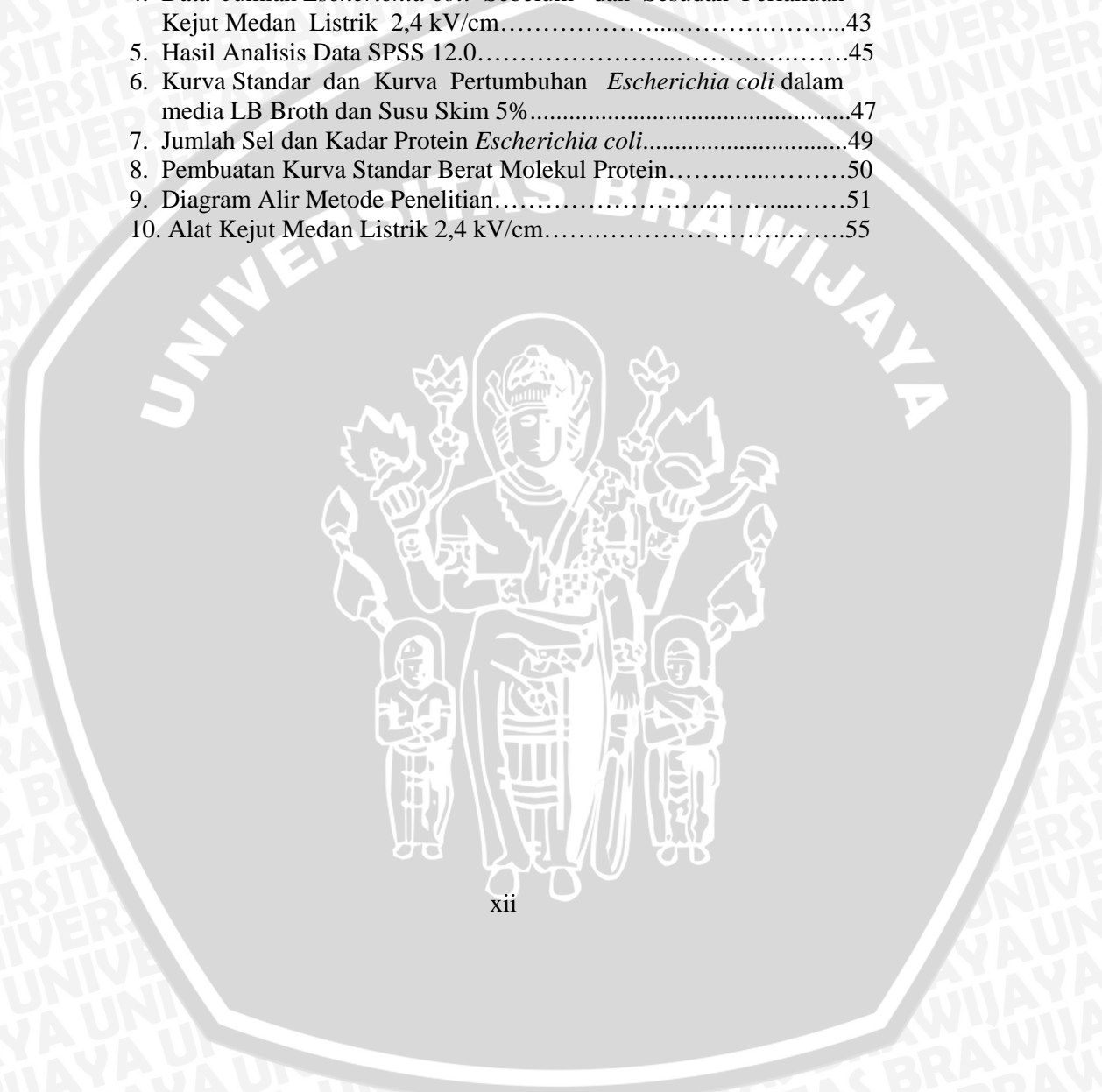
1. Komposisi Susu Sapi.....	4
2. Komposisi Susu Bubuk Skim.....	5
3. Tabulasi Keberadaan Pita Protein <i>Escherichia coli</i> pada Media LB Broth dan Susu Skim 5% Sebelum dan Sesudah Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Komposisi Bahan yang Digunakan.....	39
2. Komposisi <i>Staining dan Destaining Solution</i> .....	41
3. Komposisi media yang digunakan.....	42
4. Data Jumlah <i>Escherichia coli</i> Sebelum dan Sesudah Perlakuan Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....	43
5. Hasil Analisis Data SPSS 12.0.....	45
6. Kurva Standar dan Kurva Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> dalam media LB Broth dan Susu Skim 5%.....	47
7. Jumlah Sel dan Kadar Protein <i>Escherichia coli</i> .....	49
8. Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul Protein.....	50
9. Diagram Alir Metode Penelitian.....	51
10. Alat Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.....	55



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Bahan pangan selain merupakan sumber gizi bagi manusia, juga sebagai sumber makanan bagi perkembangan mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme pada makanan dapat mengakibatkan berbagai perubahan fisik maupun kimiawi yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut tidak layak dikonsumsi, dan dapat menimbulkan penyakit yang ditimbulkan oleh makanan (*foodborne disease*). Bahan pangan dapat bertindak sebagai perantara atau substrat untuk tumbuhnya mikroorganisme patogen. Menurut Supardi dan Sukamto (1999) *Escherichia coli* umumnya merupakan flora normal saluran pencernaan manusia dan hewan. Sejak 1940 di Amerika Serikat telah ditemukan strain-strain *E. coli* yang tidak merupakan flora normal saluran pencernaan. Strain tersebut menyebabkan diare pada bayi. Serotipe dari *E. coli* yang dapat menyebabkan diare pada manusia disebut *E. coli Enteropatogenik*. Menurut Holt dkk. (2000) bakteri *E. coli* selain dapat menyebabkan penyakit diare, dapat juga menimbulkan infeksi saluran urin dan infeksi nosokomial seperti *septicemia* dan *meningitis* pada manusia. Di negara-negara berkembang *E. coli* patogen menyebabkan kurang lebih seperempat dari seluruh kejadian diare (WHO 1990 dalam Triatmodjo, 2007).

Susu merupakan bahan pangan yang mengandung nutrisi lengkap yang mempunyai kandungan protein tinggi sehingga cocok untuk segala mikroorganisme termasuk bakteri *E. coli*. Mikroorganisme ini mampu berkembang dengan cepat, sehingga dalam beberapa jam penyimpanan susu segar akan mengalami kerusakan mikrobiologis. Pengaruh yang disebabkan oleh baiknya nilai gizi susu tersebut menjadikan susu sangat mudah mengalami kerusakan yang disebabkan oleh mikroorganisme (Dwijoseputro, 1998). Bahan makanan yang sering terkontaminasi oleh *E. coli* diantaranya ialah daging ayam, daging sapi, daging babi selama penyembelihan, ikan dan makanan-makanan hasil laut lainnya, telur dan produk olahannya, sayuran, buah-buahan, sari buah, serta bahan minuman seperti susu dan lainnya (Supardi dan Sukamto, 1999).

Beberapa tahun terakhir, teknologi pengawetan makanan nontermal semakin berkembang yang diharapkan teknologi-teknologi tersebut dapat menginaktifkan mikroorganisme perusak atau patogen tanpa mempengaruhi aroma, rasa, dan nutrisi pada produk makanan. Salah satu teknologi pengawetan susu yang sedang berkembang adalah kejutan medan listrik (*pulsed electric field*). Keuntungan menggunakan teknologi listrik tegangan tinggi antara lain mampu mempertahankan kesegaran, meliputi kualitas organoleptik baik rasa, aroma, maupun tekstur (Castro dkk., 1993 dalam Rowan dkk., 2000).

Perlakuan kejutan listrik tegangan tinggi dapat mengakibatkan kematian yang besar dengan semakin besar intensitas listrik yang digunakan, jumlah kejutan dan lama kejutan (Hülsheger dkk. 1983 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Selain itu ketahanan mikroba terhadap kejutan listrik juga dipengaruhi oleh nutrisi dan media, pengaliran listrik dengan media yang kaya akan protein menyebabkan terjadinya penurunan nilai efektifitas kematian dari mikroba yang terkandung (Gooshing dalam Gould, 1995).

Sel bakteri tersusun atas berbagai komponen selular, misalnya dinding sel, membran, periplasma, dan sitoplasma, yang penyusunnya terdiri atas beberapa komponen kimia seperti protein, peptidoglikan, fosfolipid, selulosa, dan turunan gula. Protein merupakan komponen kimia terbesar kedua setelah air (15%) pada sebuah sel bakteri (Albert dkk., 1994). Protein merupakan salah satu komponen esensial dalam sel bakteri yang berhubungan dengan fungsi fisiologi dan metabolisme sel seperti berperan pada sintesis protein, regulasi genetik, transpor, pertahanan diri, dan katalisis (McKee dan James, 2003).

Kejut medan listrik menyebabkan perubahan membran plasma sel, sehingga molekul kecil mudah masuk dan sel akan membengkak dan kemudian pecah (elektroforasi) (Vega-Mercado 1996 dalam U. S. Food and Drug Administration 2000), Menurut Lado dkk (2004) kejutan listrik tegangan tinggi digunakan untuk menginaktifkan mikroorganisme, menurunkan metabolit sel, memanipulasi organel intraselular dan makromolekul.

Dengan mengacu beberapa keuntungan kejut medan listrik, ingin diketahui pengaruh kejut medan listrik terhadap penurunan jumlah dan profil pita protein *Escherichia coli*.

### 1.2 Perumusan masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh kejut medan listrik terhadap penurunan jumlah *Escherichia coli* dan profil pita protein bakteri tersebut.

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kejut medan listrik dalam menurunkan jumlah bakteri *Escherichia coli* dan profil pita protein bakteri tersebut.

### 1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah menerapkan kejut medan listrik untuk meningkatkan kematian bakteri *Escherichia coli* dalam susu, sehingga dapat memperpanjang tenggang kerusakan bahan pangan sebelum pengolahan selanjutnya. Dengan demikian bahan makanan tetap segar dan kualitas organoleptiknya tetap bertahan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Susu

##### 2.1.1 Susu Sapi

Susu didefinisikan sebagai cairan berwarna putih, yang diperoleh dari pemerahan sapi atau hewan menyusui lainnya, yang dapat dikonsumsi dan digunakan sebagai bahan pangan yang sehat. Dipandang dari segi gizinya, susu merupakan makanan yang hampir sempurna. Komposisi susu lebih lengkap daripada bahan pangan asal hewan lain, karena komponen-komponen yang dibutuhkan oleh tubuh manusia semuanya terdapat dalam susu yaitu protein, lemak, karbohidrat, mineral, vitamin, dan air (Hadiwiyoto, 1994).

Susu segar mempunyai pH 6,6-6,7. Nilai pH ini banyak dipengaruhi oleh kandungan fosfat, sitrat, dan asam-asam amino terlarut. Susu juga memiliki semua nutrisi yang baik untuk pertumbuhan berbagai mikroorganisme (Spreer, 1998). Susu merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang menyebabkan susu mudah rusak akibat aktivitas organisme yang mengkontaminasi, dalam keadaan demikian itu susu tidak layak untuk dikonsumsi. Untuk itu perlu cara pengawetan susu yang tepat tanpa merusak kualitas susu tersebut (Hadiwiyoto, 1994). Adapun komposisi kimia dari susu dapat dilihat pada Tabel 1. dibawah ini :

Tabel 1. Komposisi Susu Sapi

Komponen	Rata-rata (%)	Kisaran (%)
Air	86,6	85,4 – 87,7
Lemak	4,1	3,4 – 5,1
Protein	3,6	3,3 – 3,9
Laktosa	5,0	4,9 – 5,0
Abu	0,7	0,68 – 0,77

Sumber : Fennema (1996).

Sampel susu sapi jenis *Guensey*, *Ayshire*, *Brew Swiss*, *Holstein* dan *Shortorn*



### 2.1.2 Susu Skim

Susu skim merupakan bagian susu yang tertinggal sesudah krim diambil sebagian atau seluruhnya. Susu skim mengandung semua zat makanan susu, sedikit lemak dan vitamin yang larut dalam lemak (A, D, E dan K) dalam jumlah yang rendah dan sumber mineral serta protein untuk orang dewasa (Buckle dkk., 1995) susu skim merupakan sumber protein hewani yang tinggi dan mengandung laktosa yang tinggi pula. Susu mampu memberi kontribusi pencoklatan karena keberadaan laktosa dan protein yang tinggi (Eckles dkk., 1993).

Tabel 2. Komposisi Susu Bubuk Skim

Komposisi	Jumlah (%)
Protein	35,9
Lemak	0,8
Laktosa	52,3
Air	3
Abu	8

Sumber : DCP (2002).

### 2.2 Bakteri-Bakteri Patogen Dalam Susu

Susu dapat merupakan sumber penyakit bagi manusia. Secara garis besar, penyakit yang dibawa oleh susu dapat berasal dari dua sumber yaitu langsung dari sapi, karena banyak penyakit yang diderita sapi dapat juga mempengaruhi manusia dan penularan susu dari sumber luar selama pengangkutan dari sapi sampai ke tangan konsumen. Beberapa bakteri yang dapat menimbulkan penyakit yang berasal dari susu antara lain *Mycobacterium bovis* yang menyebabkan penyakit *Tuberculosis* yaitu penyakit pada sapi yang dapat dipindahkan kedalam susu, terutama jika ambingnya terinfeksi, *Brucella abortus* yang menyebabkan terjadinya keguguran kandungan, *Coxiella burnetti* yang dapat menyebabkan penyakit Demam Q yaitu penyakit seperti radang paru-paru yang dapat disebarkan melalui udara (Buckle dkk., 1995). Beberapa strain *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare pada bayi dan anak-anak (Davis, 2007).

## 2.3 *Escherichia coli*

### 2.3.1 Habitat dan Ciri *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerobik dan mempunyai habitat dalam saluran pencernaan dari hewan yang sehat atau terkena penyakit. (Todar, 2002).

*E. coli* mempunyai ukuran 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  x 2,0-6,0  $\mu\text{m}$ , merupakan bakteri yang motil atau nonmotil. Suhu optimal tumbuh 37°C. D-Glukosa dan karbohidrat yang dikatabolisme dengan membentuk gas dan asam (Holt dkk., 2000).

Menurut Supardi dan Sukanto (1999) Bahan makanan yang sering terkontaminasi oleh *E. coli* diantaranya ialah daging ayam, daging sapi, daging babi selama penyembelihan, ikan dan makanan-makanan hasil laut lainnya, telur dan produk olahannya, sayuran, buah-buahan, sari buah, serta bahan minuman seperti susu dan lainnya.

### 2.3.2 Patogenitas *Escherichia coli*

Lebih dari 700 tipe antigenik (*serotype*) yang dikenal berdasarkan pada antigen O, H, dan K. *E. coli* merespon 3 tipe dari infeksi pada manusia yaitu *urinary tract infection* (UTI), *neonatal meningitis* dan *intestinal disease* (*gastroenteritis*) (Todar, 2005).

Penyakit intestinal yang disebabkan *E. coli*, terdapat 5 kelas (*virotipe*) *E. coli* menyebabkan penyakit diare yang sekarang dikenal yaitu *Enterotoksigenik E. coli* (ETEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Enteropatogenik E. coli* (EPEC), *Enteroadgregative E. coli* (EAaggEC), dan *Enterohemorragic E. coli* (EHEC) (Todar, 2002).

*Enterotoksigenik E. coli* (ETEC) adalah *E. coli* patogen penyebab utama diare akut dengan dehidrasi pada anak-anak dan orang dewasa di negara-negara yang mempunyai 2 musim maupun 3 musim. *ETEC* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan terjadinya ekskresi cairan elektrolit tubuh sehingga timbul diare dengan dehidrasi. Secara imunologis enterotoksin yang dihasilkan oleh *ETEC* sama dengan enterotoksin yang dihasilkan oleh *V. cholera*. Enterotoksin *ETEC* terdiri dari dua macam yaitu: 1) *Labile Toxin* (LT) yang mempunyai berat molekul yang tinggi dan tidak tahan panas (musnah pada pemanasan 60°C selama 10 menit); toksin inilah yang mirip dengan *cholera toxin*. 2) *Stabile Toxin* (ST)

yang mempunyai berat molekul rendah, tahan pada pemanasan. Manusia dapat berperan sebagai *carrier* kuman ini, yaitu sebagai pembawa kuman tetapi dia sendiri tidak sakit. Transmisi kuman dapat berlangsung secara *food-borne* maupun *waterborne*. Di daerah endemik seperti halnya Indonesia, *ETEC* merupakan penyebab utama diare akut yang mirip cholera serta merupakan penyebab *travellers diarrhea* (Simanjatak dkk., 1983). Menurut Anonymous (2007), dosis yang dapat menimbulkan gejala infeksi berkisar  $10^8 - 10^{10}$  sel.

*Enteroinvasive E. coli* (EIEC) mirip dengan *shigella* dalam hal mekanisme kepatogenesis dan berbagai macam penyakit klinik yang mereka hasilkan. *EIEC* menembusi dan memultiplikasi antara sel epitel dari kolon yang menyebabkan penyebaran kerusakan sel. Sindrom klinik yang identik dengan *dysentri Shigella* dan termasuk pula diare seperti disentri dengan demam. EIEC melakukan spesifik adhesin seperti pada *shigella invasive*, tidak menghasilkan LT atau ST, tidak seperti *Shigella*, mereka juga tidak menghasilkan racun Shiga (Todar, 2002). Menurut Anonymous (2007), dosis yang dapat menimbulkan gejala infeksi berkisar lebih dari  $10^6$  sel per gram makanan.

*Enteropatogenik E. coli* (EPEC) menyebabkan diare berdarah, yang dihubungkan dengan penempelan dan jaringan akut proses perusakan, mungkin disebabkan oleh racun yang sama dengan *Shigella dysenteriae*, juga yang disebut dengan veritoksin (Feng dan Stephen, 2002).

*Enteroadgregative E. coli* (EAggEC) merupakan organisme dengan kemampuan untuk menempel pada kultur jaringan sel dengan berbagai cara. Strain ini dihubungkan dengan diare terus-menerus pada anak kecil. Bakteri tipe ini mirip dengan *ETEC*, dimana bakteri yang menempel pada mukosa usus dan menyebabkan diare tidak berdarah tanpa *invading* atau menyebabkan inflamasi. Hal ini dianggap bahwa organisme menghasilkan racun dengan beberapa bentuk. Baru-baru ini, plasmid yang mengkode racun khusus yang tahan terhadap pemanasan telah diisolasi dari strain tipe ini yang disebut racun EAST (*Enteroadgregative ST*) (Todar, 2002).

*Enterohemorragik E.coli* (EHEC) pertama diakui sebagai patogen perusak pangan yang sangat diwaspadai. Satu-satunya strain *EHEC* adalah O157:H7 yang menyebabkan diare. Pertumbuhan dari strain ini dalam usus, menghasilkan sejumlah besar racun-racun yang

menyebabkan kerusakan pada usus dan organ tubuh yang lain (Snyder, 1998). Menurut Anonymous (2007) dosis yang dapat menimbulkan gejala infeksi sangat rendah, beberapa kasus *EHEC* yang terdeteksi dalam makanan sekitar 2 sel per gram.

### 2.3.3 Protein *Escherichia coli*

Protein merupakan makromolekul yang dikandung oleh satu atau lebih rantai. Molekul protein menyusun komponen sel *E.coli* antara lain : pada membran sel terluar, komponen utama penyusunnya adalah lipopolisakarida (LPS) dan protein yang paling besar terdapat pada porin. Pada dinding sel tersusun atas peptidoglikan yang berikatan secara kovalen berikatan dengan membran terluar. Peptida yang terdapat pada dinding sel merupakan tetrapeptida yang mengandung L-Ala-D-Gly-DAP-D-Ala, dimana DAP adalah *asam diaminopimelik*. Membran terdalam *E. coli* mempunyai tebal 8 nm yang mengandung 60% protein dan 40% fosfolipid. Periplasma sel *E. coli* mengandung protein esensial untuk pengikatan nutrisi, enzim degradatif (*protease, endonuklease*), enzim detoksin (*beta laktamase*), sintesis peptidoglikan, sitokrom (transport elektron) dan protein kemotaksis atau protein kemosensing. Periplasma mengandung kira-kira 80.000 protein. Sitoplasma *E. coli* mengandung DNA kromosomal, RNA, ribosom atau poliribosom (untuk sintesis protein), badan golgi, ion esensial (120 juta), molekul organik berukuran kecil (18 juta) dan sekitar 2,1 juta protein. Ribosom prokariotik tersusun atas dua subunit yaitu subunit 30S dan 50S. Subunit 20S mempunyai 21 protein yang berikatan dengan 16S rRNA. 50S mempunyai 34 protein yang berikatan dengan 23S dan 5S rRNA (Sundararaj dan An Chi, 2003).

## 2.4 Metode Pengawetan pada Susu

### 2.4.1 Pasteurisasi Susu

Pasteurisasi panas pada susu perlu dilakukan untuk mencegah penularan penyakit dan mencegah kerusakan karena mikroorganisme dan enzim. Kondisi pasteurisasi dimaksudkan untuk memberikan perlindungan maksimum terhadap penyakit yang dibawa oleh susu (Buckle dkk., 1995).

Menurut Pelczar dan Chan (1988) pasteurisasi secara komersial dapat diterapkan dengan metode suhu rendah (*low-temperature holding* atau LTH) dengan suhu 62,8°C selama 30 menit dan metode suhu tinggi waktu singkat (*high temperature short time* atau HTST) pada suhu 71,7°C selama 15 detik. Metode *Ultra High Temperature* atau UHT pada suhu 148,9°C selama satu hingga dua detik adalah metode yang kini dapat diterapkan pada susu. Menurut Ray (2001) bakteri termofilik tetap akan bertahan hidup saat pasteurisasi namun tidak membunuh spora bakteri. Oleh karena itu pasteurisasi dengan UHT penting dilakukan agar spora bakteri dan kontaminasi lain dapat dicegah. Metode pasteurisasi antara lain menyemprotkan air panas pada wadah, mengalirkan air panas dan menggunakan *heat exchanger*.

Selain menggunakan pemanasan dalam proses pasteurisasi, beberapa teknologi nontermal digunakan untuk pengawetan susu seperti tekanan hidrostatik tinggi, kejutan listrik tegangan tinggi, intensitas cahaya tinggi, dan bahan-bahan kimia (Canovas dkk., 1998).

#### 2.4.2 Kejut Medan Listrik

Bakteri *Esherichia coli* dalam makanan umumnya dapat dibunuh dengan pemanasan seperti proses pasteurisasi. Akan tetapi selama proses pemanasan menyebabkan sejumlah besar energi dapat ditransfer pada makanan. Energi ini akan memicu reaksi yang tidak diinginkan dan mengubah struktur makanan, seperti pemanasan yang diperlakukan pada susu menyebabkan kehilangan vitamin, nutrisi esensial, dan rasa. Oleh karena kualitas makanan sangat penting bagi konsumen, dikembangkan beberapa metode pengawetan makanan nontermal yang meminimalkan degradasi nutrisi dalam makanan. Beberapa metode tersebut antara lain tekanan tinggi hidrostatik energi magnet, kejutan listrik tegangan tinggi, irradiasi, bahan-bahan kimia, biokimia (Canovas dkk., 1998).

Kejutan listrik bertegangan tinggi (*Pulse electric field*) merupakan metode pengawetan non-termal yang menggunakan arus listrik secara tiba-tiba untuk menginaktivasi mikroba dan tidak menyebabkan perubahan terhadap komponen kualitas makanan. Kejutan listrik bertegangan tinggi dapat digunakan pada produk makanan cair dan semi cair. Penggunaan kejutan listrik bertegangan

tinggi mampu memberikan kualitas makanan cair lebih segar dengan rasa yang baik, kandungan nutrisi dan memperpanjang umur simpan produk makanan. Penggunaan PEF meliputi peletakan makanan yang akan diuji diantara elektroda dengan tegangan tinggi yaitu sekitar 20-80 kV (biasanya digunakan mikrodetik). Adanya tegangan tinggi pada pemrosesan ini menyebabkan penginaktifan mikroba. Setelah dilakukan pengujian dengan alat ini, makanan dikemas secara aseptis dan disimpan dibawah kondisi suhu lemari es (Ramaswamy dkk., 2005).

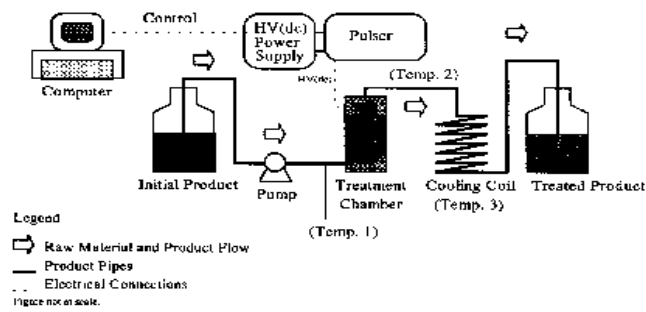
Penggunaan kejutan listrik tegangan tinggi mampu membunuh berbagai mikroorganisme antara lain *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klesiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Kejutan listrik mempunyai pengaruh letal terhadap berbagai macam vegetatif bakteri, jamur, dan kapang. Keefektivitasan dalam menginaktifkan spora dapat menggunakan kombinasi perlakuan dalam PEF yaitu dengan suhu atau faktor yang lain sesuai dengan penelitian yang dilakukan.

#### **2.4.2.1 Klasifikasi Proses Kejut Medan Listrik Berdasar Aliran Bahan**

Pasteurisasi dengan kejut medan listrik diaplikasikan pada makanan dengan waktu kejutan yang sangat pendek yaitu antara mikrodetik dan milidetik. Sistem pemrosesan kejutan listrik terdiri atas sumber tenaga, kapasitor, tumbol, wadah uji, tempat pengepakan aseptis, tegangan, arus, dan pengatur suhu. Wadah uji yang biasa digunakan adalah model *statis* dan *continous*. Pada model *statis*, semua volume makanan diuji dalam sebuah wadah (chamber), dan biasa digunakan dalam penelitian skala laboratorium. Sedangkan wadah *continous*, makanan dialirkan secara *continous* selama pemrosesan dan digunakan dalam skala industri (Canovas dkk., 1998).

Proses kejut medan listrik secara kontinyu dapat dilihat pada gambar 1., dengan komponen utama yaitu sumber energi, kapasitor,

“chamber”, pompa dan pendingin (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).



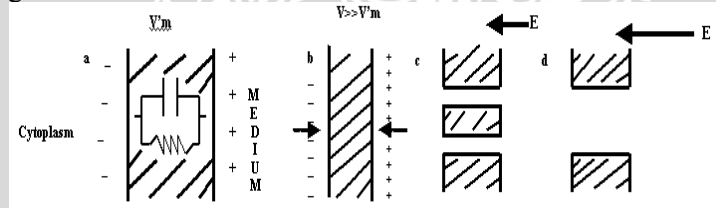
Gambar 1. Proses kejut medan listrik secara kontinyu (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

### 2.4.2.2 Mekanisme Inaktivasi Mikroba

Berdasarkan U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (2000) secara garis besar mekanisme inaktivasi mikroba akibat proses kejut medan listrik yaitu “electrical breakdown” dan “electroporation”.

#### a. Electrical breakdown

” Electrical breakdown” dapat dijelaskan melalui ilustrasi gambar berikut ini :



Gambar 2. Skema perusakan membran mikroba akibat kejut listrik.

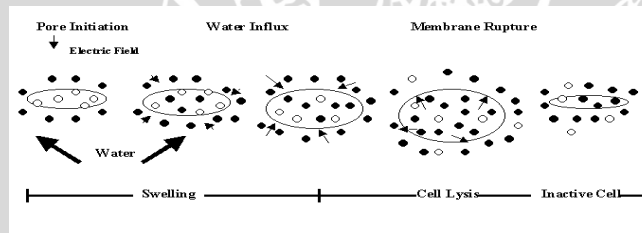
(U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

Membran sel mikroorganisme diumpamakan sebagai kapasitor yang dipenuhi dengan energi listrik dengan beda potensial  $V \cdot m$ .  $V$  adalah medan listrik diluar sel. Peningkatan intensitas  $V$  dapat mengurangi ketebalan membran sel atau terjadi kompresi pada membran sel yang berasal dari luar. Ketika  $V$  terus meningkat dan mencapai  $V$  kritis ( $V_c$ ) maka terbentuk pori yang menyebabkan "breakdown" pada membran sel. Jika pori yang terbentuk kecil maka "breakdown" ini bersifat reversibel dan berubah menjadi irreversibel jika pori yang terbentuk banyak dan besar (Zimmermann, 1988 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

#### b. Electroporation

"Electroporation" merupakan fenomena dimana sel mikroba terekspos medan listrik bertegangan tinggi yang kemudian merusak lapisan lemak dan protein pada membran sel (Castro dkk., 1990 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Setelah dikejutkan dengan medan listrik bertegangan tinggi, plasma membran sel menjadi permeabel terhadap air dan molekul kecil sehingga terjadi pembengkakan yang menyebabkan membran sel pecah seperti terlihat pada gambar (Vega-Mercad, 1996 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

Menurut Mizumo dan Hazamizu dalam Gould (1995) kejutan medan listrik menyebabkan terjadinya modifikasi permukaan sel dimana dari pengamatannya dengan mikroskop elektron menemukan adanya lubang pada dinding sel, sedangkan pada sel yang tidak dialiri listrik tidak ditemui hal ini.



Gambar 3. Elektroforasi membran sel (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).



### 2.4.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Inaktivasi Mikroba

Ada 3 faktor yang mempengaruhi inaktivasi mikroba dengan proses kejut medan listrik, yaitu kondisi proses (intensitas medan listrik, waktu, dan suhu perlakuan), produk pangan (konduktivitas, pH, dan partikel) serta mikroba (jenis, jumlah, dan tahap pertumbuhan) (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition).

#### 1. Faktor Kondisi Proses

##### a). Intensitas Medan Listrik

Intensitas listrik merupakan faktor utama yang mempengaruhi inaktivasi mikroba. Inaktivasi mikroba akan meningkat dengan meningkatnya intensitas listrik disamping itu juga terjadi peningkatan potensial transmembran (Qin dkk. 1998 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

##### b). Waktu Treatment

Waktu treatment diartikan sebagai jumlah kejutan dan lama kejutan. Dengan meningkatnya variabel-variabel ini, akan meningkatkan inaktivasi mikroba (Sale dan Hamilton 1967 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

##### c). Suhu Treatment

Dengan intensitas kejut listrik yang konstan, inaktivasi akan meningkat dengan meningkatnya suhu, karena dalam aplikasi kejut listrik tegangan tinggi menyebabkan peningkatan suhu dalam makanan (Jayaram dkk. 1992; Dunn dan Pearlman 1987 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Pengaruh terhadap suhu perlakuan yang tinggi akan merubah kefluiditasan membran sel dan permeabilitas, dimana akan meningkatkan kepekaan sel terhadap gangguan secara mekanik (Hulsheger dkk. 1981 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

## 2). Faktor Produk Pangan

### a). Konduktivitas dan pH

Konduktivitas merupakan kemampuan bahan untuk menghantarkan arus listrik. Bahan pangan dengan konduktivitas yang tinggi menyebabkan penurunan resistensi di dalam “Chamber”, penurunan intensitas medan listrik dapat menurunkan laju inaktivasi mikroba. Terdapat penelitian yang menyebut bahwa ketika pH bahan diturunkan dari 6,8 menjadi 5,7, rasio inaktivasi meningkat dari 1,45 menjadi 2,221 “log cycle” (Canovas dkk., 1998).

### b). Partikel Bahan Pangan

Inaktivasi mikroba dalam partikel bahan pangan berbentuk cair menjadi objek penelitian untuk mengetahui pengaruh faktor ini *E. coli*, *S. aureus*, *L. innocua*, dan *L. acidophilus* disuspensikan dalam partikel alginat berdiameter 2 mm dan dicari laju inaktivasinya. Hasil penelitian menyebutkan bahwa proses kejutan medan listrik efektif dalam membunuh mikroba yang tersuspensi dalam partikulat (Dunne, 1996 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition).

### c). Konsep “Hurdle”

Secara umum kombinasi beberapa faktor seperti pH, konduktivitas, penambahan antimikrobia selama perlakuan kejutan medan listrik dalam meningkatkan laju inaktivasi mikroba (U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition).

## 3). Faktor Mikroorganisme

### a). Jenis mikroorganisme

Bakteri gram positif lebih resisten terhadap proses kejutan medan listrik dibandingkan bakteri gram negatif akibat perbedaan kandungan lemak pada dinding selnya (Hülshager dkk. 1983 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Khamir lebih sensitif terhadap arus listrik daripada bakteri (Sale dan Hamilton 1967; Qin dkk 1995 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000).

**b). Jumlah Mikroba**

Jumlah mikroba dalam bahan pangan berpengaruh terhadap laju inaktivasinya, semakin banyak mikroba yang terkandung dalam bahan makanan maka semakin rendah laju inaktivasinya (Canovas dkk., 1998).

**c). Tahap Pertumbuhan Mikroba**

Sel mikroba dalam fase logaritmik lebih sensitif terhadap proses kejutan medan listrik dibanding sel dalam fase lag dan stasioner (Hulsheger dkk., 1983 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Mikroba pada fase logaritmik lebih sensitif dibandingkan dengan mikroba pada fase stasioner. Pada fase logaritmik, sebagian besar sel melakukan pembelahan sehingga jika terekspos medan listrik maka kemungkinan terjadinya elektroporasi pada membran sel semakin besar. Pada fase ini sel membutuhkan lebih banyak energi dibandingkan dengan fase stasioner ukuran sel menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi sudah mulai habis. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan lain (Alvarez dkk., 2002).

**2.4.2.4 Penelitian yang Berhubungan dengan Kejutan Listrik Tegangan Tinggi**

Beberapa penelitian yang dilakukan terhadap pengaruh kejutan medan listrik tegangan tinggi terhadap inaktivasi *E. coli* antara lain setelah pemberian perlakuan kejutan listrik dengan tegangan 36,7 kV/cm, banyaknya kejutan 40 dengan periode waktu 25 menit mampu mereduksi 3-log *E. coli* dalam susu (Dunn 1996 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000). Menurut Grahl dkk., (1992), *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000), melaporkan jumlah kejutan yang diberikan berpengaruh dalam inaktivasi *E. coli*, dimana mempunyai kemampuan untuk mengurangi populasi *E. coli* dalam susu UHT (*Ultra High Temperature*) dengan 1,2,3-log siklus ketika diberi kejutan sebanyak 5, 10, 15, dengan kuat medan 22 kV/cm yang digunakan (Qin dan dkk., 1998 *dalam* U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2000), dilaporkan lebih dari

6-log siklus reduksi pada *E. coli* yang disuspensikan dalam SMUF (*Simulated Milk Ultrafiltrate*) menggunakan arus listrik dengan kuat medan 36 kV/cm dengan 5 tahap (50 kejutan). Suhu dalam wadah uji dipelihara dibawah 40°C selama uji PEF, dimana suhu tersebut lebih rendah daripada suhu pasteurisasi susu secara komersial (70-90°C).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Martin dkk. (1997) PEF dapat menginaktivasi *E. coli* dalam susu skim (inokulum  $10^9$  cfu/ml). Susu skim yang diinokulasikan dengan *E. coli* diuji dengan chamber *static* dan *continous*. Pengujian PEF sistem *continous* dengan kuat medan dan jumlah kejutan minimal 12,34 kV/cm dan 2,7 pada 30 kV/cm dan 30 kejutan (durasi 0,7-1.8  $\mu$ s) dapat menginaktivasi lebih banyak mikroorganisme daripada sistem statis. Hal ini juga menunjukkan bahwa kenaikan lamanya kejutan dapat meningkatkan inaktivasi *E. coli*. Inaktivasi *E. coli* menggunakan PEF lebih terbatas dalam susu skim daripada dalam larutan buffer ketika diuji dengan kondisi yang sama yaitu dengan tegangan listrik dan jumlah kejutan yang sama. Hal ini disebabkan karena susu skim memiliki hambatan listrik rendah dan adanya protein.

Bakteri *Esherichia coli* dapat dibunuh dengan pemanasan seperti proses pasteurisasi, selain itu terdapat beberapa metode yang dikembangkan seperti kejutan listrik, radiasi, dan bahan-bahan kimia. Proses pemanasan dapat menghasilkan kerusakan banyak komponen sel. Hal ini dapat menjadi bukti bahwa pemanasan berperan penting dalam meningkatkan permeabilitas membran, mendenaturasi protein sel, menyebabkan pemecahan ikatan tunggal DNA, dan mendegradasi RNA (Bunduki dkk., 1995 dalam Lado dkk., 2004). Akan tetapi pada bakteri terdapat *Heat shock* respon yang merupakan mekanisme perlindungan terhadap induksi panas yang dapat merusak protein dengan mensintesis suatu rangkaian spesifik dari protein yang disebut dengan *Heat shock protein* (HSPs) (Lindquist 1986; Schlesinger 1990 dalam Chung dkk., 2006).

Kejutan listrik tegangan tinggi juga dapat mengubah ekpresi molekular chaperone pada *Listeria monocytogenes*. Menurut Lefers, (2004), molekular chaperone merupakan suatu protein yang membantu dalam proses pelipatan protein sekunder dan mencegah protein dari konformasi inaktif. Penelitian yang dilakukan oleh Lado dkk. (2004), menunjukkan bahwa dengan perlakuan kejutan listrik

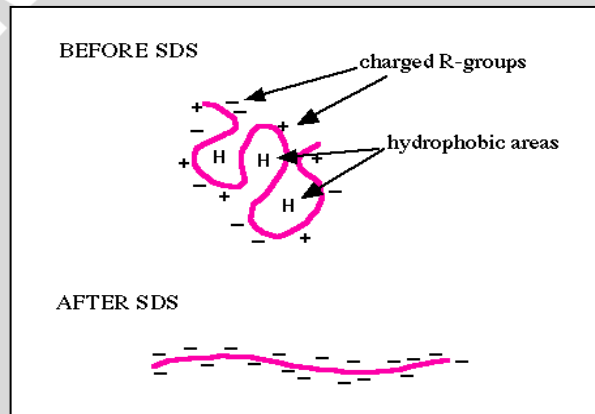
tegangan tinggi 15 kV selama 25 mikrodetik terhadap bakteri *Listeria monocytogenes*, dapat menurunkan tingkat chaperone yang dihubungkan dengan bentuk dari membran sel. Pori ini akan mengizinkan chaperone sel untuk keluar. Penurunan tingkat chaperone setelah perlakuan kejutan listrik mengindikasikan ukuran dari pori yang telah terinduksi listrik tidak memenuhi difusi pasif dari GroES (~ 10 kilodalton), DnaJ (~ 45 kilodalton), dan GroEL (~ 60 kilodalton). Perlakuan kejutan listrik subletal sementara dapat mengganggu proses transkripsi, sehingga menyebabkan perubahan ekspresi molekular chaperone GroEL, GroES, dan DnaJ. Sel dengan molekular chaperone yang berubah menjadi lebih sensitif terhadap pemanasan. Pada penelitian yang dilakukan Lado dkk (2004), untuk mengetahui pola pita protein dan memisahkan protein bakteri menggunakan metode *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) dengan konsentrasi gel 10% untuk GroEL dan DnaJ, konsentrasi gel 15% digunakan untuk GroES. Pita protein yang sudah terpisah, ditansfer pada membran nitroselulosa.

Menurut Gerhardt dkk. (1981) SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) adalah teknik yang sederhana dan paling efektif untuk menguji profil protein dari fraksi subseluler. SDS-PAGE merupakan metode yang dilakukan untuk memperkirakan ukuran protein, kemurnian protein, kuantifikasi protein, monitoring integritas protein, komposisi protein serta analisis jumlah dan ukuran subunit protein.

SDS-PAGE dibagi menjadi dua sistem gel, yaitu *continous* dan *discontinous*. Sistem *continous* hanya menggunakan *separating* gel, sedangkan sistem *discontinous* memakai *separating* gel dan *stacking* gel. Sistem *discontinous* lebih populer karena sistem ini memberikan resolusi tinggi yang disebabkan oleh penggunaan *stacking* gel (Burden dan Whitney, 1995 ; Hames, 1998). *Stacking* gel yang digunakan memiliki pH 6,8 sedangkan *separating* gel memiliki pH 8,8 (Hames, 1998 ; Patel, 1994).

SDS merupakan detergen yang mempunyai sifat polar dan nonpolar yang dapat mengikat protein sedemikian rupa sehingga bagian nonpolar dari SDS yang bermuatan negatif berhubungan langsung atau terekspose pada pelarut. Berdasarkan preparasi sampel, elektroforesis dibagi dua yaitu : (1) *native* atau *nondenaturing* atau *nondisosiasi PAGE*, dan (2) *denaturing* atau

*disosiasi* atau *SDS-PAGE*. Pada sistem *native* atau *nondenaturing PAGE (non-dissociation)*, protein dipisahkan pada bufer yang mempunyai pI tertentu. Ketika bergerak di dalam gel, protein tetap berada dalam struktur tiga dimensi (*native*). Ukuran suatu protein ditentukan oleh berat molekul, tingkat hidrasi dan bentuknya. Pada sistem ini, sulit memperkirakan pola migrasi protein. Pada umumnya, sistem ini hanya dipakai untuk memisahkan sampel dengan berat molekul yang sama berdasarkan muatannya. Pada sistem denaturing, protein dielektroforesis pada buffer yang juga mengandung detergen ionik SDS. SDS ini akan mengikat pada bagian hidrofobik dan residu asam amino sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein (menjadi *unfolding*). Selain itu, SDS juga menyebabkan seluruh rantai peptida bermuatan negatif (Gambar 4). Dalam kondisi ini, ukuran protein hanya tergantung pada berat molekulnya. Kompleks protein-SDS bergerak dalam gel poliakrilamid dengan kecepatan yang tergantung pada berat molekulnya. Dengan demikian maka, SDS-PAGE digunakan untuk menentukan berat molekul suatu *crude protein* (Fatchiyah, dkk., 2006).



Gambar 4. Pengaruh SDS Terhadap Struktur Protein (Rybicki dkk., 2006).

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2007. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang untuk perhitungan jumlah *E. coli* dan analisis profil protein *E. coli* sebelum dan sesudah perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Metode penelitian ini adalah percobaan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok yang disusun secara faktorial dengan 2 faktor, yaitu :

Faktor pertama : Jenis media pertumbuhan *Escherichia coli*

M1 = LB Broth (Miller)

M2 = Susu skim 5% (Anlene Gold)

Faktor kedua : Waktu perlakuan kejut listrik

W1 = 0 menit (kontrol)

W2 = 4 menit

W3 = 5 menit

W4 = 6 menit

Dari kedua faktor yang digunakan, diperoleh 8 kombinasi perlakuan yang masing-masing di ulang sebanyak 3 kali. Kombinasi perlakuan kedua faktor tersebut dapat dituliskan sebagai berikut :

Perlakuan	Waktu perlakuan kejutan listrik	Kombinasi
M1	W1	M1W1
	W2	M1W2
	W3	M1W3
	W4	M1W4
M2	W1	M2W1
	W2	M2W2
	W3	M2W3
	W4	M2W4

Keterangan:

M1W1 : Media LB Broth selama 0 menit (kontrol)

M1W2 : Media LB Broth selama 4 menit

M1W3 : Media LB Broth selama 5 menit

M1W4 : Media LB Broth selama 6 menit

M2W1 : Media Susu skim 5% selama 0 menit (kontrol)

M2W2 : Media Susu skim 5% selama 4 menit

M2W3 : Media Susu skim 5% selama 5 menit

M2W4 : Media Susu skim 5% selama 6 menit

### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 1. Tahap Pendahuluan

Adapun langkah-langkah dalam tahap pendahuluan yaitu:

- a. Sterilisasi ruangan beserta alat kejutan listrik selama 24 jam.
- b. Semua peralatan disemprot dengan alkohol 70%, kemudian diletakkan dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang berada dalam ruang UV, kemudian UV di dalam LAF dinyalakan selama 30 menit (dapat dilihat pada lampiran 11).

#### 2. Persiapan media dan peralatan

- Pembuatan media Garam Fisiologis 0,85% , LB Broth, dan *MacConkey Agar*
- Sterilisasi alat dan media dalam *autoclave* 121°C selama 2 jam.



- Sterilisasi media susu skim 5% dengan pemanasan suhu 72°C dan dipertahankan selama 15 menit

### 3. Perlakuan dengan alat kejutan listrik

Media LB Broth dan Susu skim 5% yang mengandung sekitar  $10^9$  sel/ml *E. coli* sebanyak 11 mL diperlakukan dengan medan listrik bertegangan 12 kV dengan jarak elektroda 5 cm selama 4, 5, dan 6 menit.

### 3.4 Perhitungan Jumlah Bakteri *Escherichia coli*

Perhitungan jumlah bakteri *Escherichia coli* dilakukan pada media LB Broth yang ditambahkan *Escherichia coli* sekitar  $10^9$  sel/ml pada fase eksponensial (jam ke-10) dan susu skim 5% (jam ke-2) ditambahkan *Escherichia coli* sekitar  $10^9$  sel/ml pada fase eksponensial, kemudian kedua media tersebut sebanyak 11 ml diperlakukan dengan kejutan medan listrik 2,4 kV/cm selama 0 menit (kontrol), 4 menit, 5 menit, dan 6 menit, masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Kemudian dilakukan seri pengenceran yaitu tiap perlakuan sampel diambil 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam 0,9 ml media garam fisiologis steril untuk pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$  yang dilakukan di dekat busen dan kemudian dihomogenisasi dengan vorteks. Sampel pada pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-8}$  sebanyak 0,1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dituang media *MacConkey* secara *pour plate*. Hal ini dilakukan secara duplo ke dalam cawan petri untuk analisa TPC (*Total Plate Count*). Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian jumlah *E. coli* sebelum dan sesudah perlakuan kejutan medan listrik dihitung dengan menggunakan syarat hitungan cawan.

Syarat hitungan cawan menurut Fardiaz (1993) adalah sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 dan 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan sehingga dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis dihitung sebagai satu koloni.

### 3.5 Analisis Profil Pita Protein *Escherichia coli*

#### 3.5.1 Preparasi Bakteri

Media LB Broth dan Susu skim 5% yang mengandung *Escherichia coli* sebanyak sekitar  $10^9$  sel/ml pada fase eksponensial (kontrol) dan setelah perlakuan kejutan listrik dengan kuat medan 2,4 kV/cm masing-masing diambil 1,5 ml dimasukkan dalam *tube*, dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Pelet sel yang diperoleh selanjutnya dicuci dengan akuades, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm 4°C selama 5 menit. Inhibitor protease *phenyl-methane-sulfonyl-fluoride* dengan konsentrasi satu milimolar ditambahkan dalam pelet sel perbandingan 1:1 untuk mencegah aktivitas protease. Sampel yang didapat jika tidak langsung digunakan disimpan pada suhu 0-4°C. Sampel tersebut selanjutnya diekstrak protein selulernya menurut Zarnowski dkk., (2001).

#### 3.5.2 Ekstraksi Total Protein Selular Sel Bakteri

Sampel pelet sel yang diperoleh dari tahap kultivasi bakteri dipanaskan dalam penangas air suhu 39°C selama 2 menit kemudian didinginkan kembali pada suhu 0°C selama 20 menit. Perlakuan ini bertujuan untuk merusak dinding sel bakteri. Setiap sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Perlakuan ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak sel yang selanjutnya disebut pelet. Pelet yang didapatkan dilarutkan dalam 100 µl *Cell Lytic B-II Bacterial Cell Lysis / Extraction Reagen* (Sigma). Suspensi tersebut diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Perlakuan ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak sel yang sudah tidak tercampur dengan debris sel. Supernatan sampel selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung eppendof baru (Zarnowski dkk., 2001).

#### 3.5.3 Analisis Pola Pita Protein dengan SDS-PAGE

Protein yang diperoleh ditentukan kadarnya dengan metode Biuret. Setiap 5 µl sampel ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 ml reagen Biuret, kemudian dikocok dengan vorteks.

Sampel tersebut selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Suspensi sampel kemudian diukur kadar proteinnya dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 550 nm (Burden dan Whitney, 1995).

Sampel protein yang diperoleh tersebut terlebih dahulu harus disetarakan kadarnya dengan sampel acuan yang memiliki kadar protein terendah. Sampel protein dengan kadar protein yang lebih tinggi daripada kadar acuan diencerkan dengan *buffer Tris-Cl* 0,1 M pH 6,8. *Sampel treatment buffer* kemudian ditambahkan ke setiap sampel protein (1:1) dan dihomogenkan dengan vorteks. Sampel kemudian diinkubasikan pada suhu 98 °C selama 4 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 detik.

Sampel protein kemudian dianalisis dengan *Sodium Dodecyl Sulphonate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. Gel yang digunakan adalah gel *discontinuous* yang terdiri dari *stacking* gel 5% dan *separating* gel 12,5% (Zarnowski dkk., 2001).

Sampel yang akan dielektroforesis diambil sebanyak 25 µl dengan menggunakan *Hamilton syringe* kemudian dimasukkan kedalam sumuran gel. Protein marker yang digunakan sebagai acuan memiliki berat molekul berkisar antara 14,4-116 kDa, yaitu *lysozyme* (14,4 kDa), *β-lactoglobulin* (18,4 kDa), *Restriction endonuclease BSP 981* (25 kD), *Lactate degydrogenase* (35 kDa), *Ovalbumin* (45 kDa), *Bovine Serum Albumin* (66,2 kDa), dan *β-galactosidase* (116 kDa) (Zarnowski dkk., 2001).

Sampel dalam gel dielektroforesis pada suhu ruang dengan arus konstan 20 mA. Gel selanjutnya dicuci dengan menggunakan campuran isopropanol-asam asetat-akuades (1:3:6) selama 30 menit kemudian dicuci menggunakan campuran metanol-asam asetat-aquades (3:1:6) selama lima menit. Gel kemudian diwarnai (*staining*) dalam 1% (w/v) *Coomasive Brilliant Blue R-250* selama 30 menit kemudian dicuci menggunakan campuran larutan metanol-asam asetat-akuades (3:1:6) sampai pita protein tampak jelas (Zarnowski dkk., 2001).

Masing-masing pita protein hasil elektroforesis dari bakteri *E. coli* pada setiap perlakuan, kemudian dihitung berat molekulnya. Berat molekul masing-masing pita protein tersebut ditentukan dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid berdasarkan kurva standar berat molekul dari protein standar. Protein

standar yang diketahui berat molekulnya dielektroforesis dan mobilitasnya (*Retention factor*) dapat dihitung dengan rumus berikut

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Kurva kalibrasi berat molekul protein standar dibuat dengan menempatkan nilai  $R_f$  sebagai sumbu X dan logaritma berat molekul sebagai sumbu Y. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan regresi  $y = a + bx$ . Berat molekul dari setiap pita protein seluler yang dimiliki oleh masing-masing strain bakteri uji dapat dicari dengan cara memasukkan nilai mobilitas ( $R_f$ ) ke dalam persamaan regresi tersebut (Caprette, 2005 : CU Boulder Organic Chemistry, 2005).

### 3.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan tiga ulangan. Data hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh lama waktu kejutan listrik dan media tumbuh terhadap penurunan jumlah bakteri *Escherichia coli*. Hasil analisis yang diperoleh jika ada beda nyata dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan selang kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ), data statistik yang diperoleh diolah menggunakan bantuan SPSS *for windows* versi 12.0. Sedangkan untuk pengamatan profil protein bakteri sebelum maupun sesudah perlakuan dengan kejut medan listrik, data yang diperoleh disajikan secara deskriptif.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

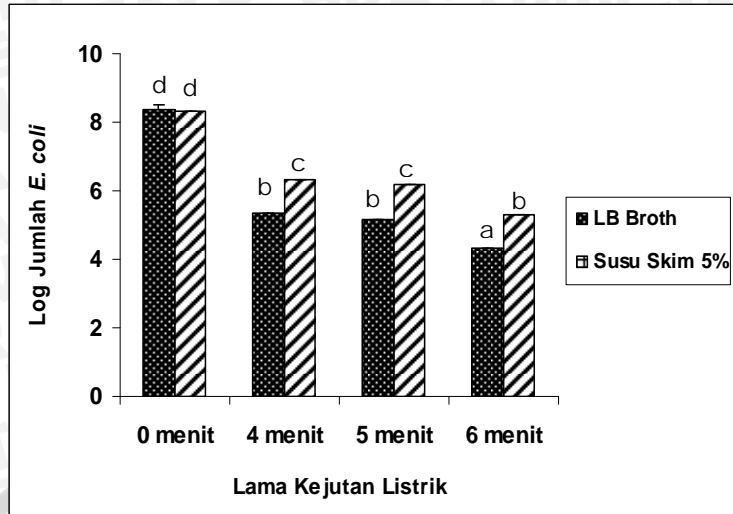
### 4.1 Penurunan Jumlah *Escherichia coli*

Rerata jumlah awal *E. coli* dalam media LB Broth berkisar  $2,42 \times 10^9$  cfu/ml, setelah pemberian kejut medan listrik 2,4 kV/cm selama 4 menit terjadi penurunan jumlah *E. coli* menjadi  $2,23 \times 10^6$  cfu/ml, selama 5 menit sebesar  $1,49 \times 10^6$  cfu/ml, dan selama 6 menit sebesar  $2,15 \times 10^5$  cfu/ml. Masing-masing perlakuan waktu memiliki nilai efektivitas kejut medan listrik terhadap jumlah *E. coli* dalam media LB Broth yaitu 32,26% untuk perlakuan 4 menit, 34,08% untuk perlakuan 5 menit, dan 43,05% untuk perlakuan 6 menit. Dengan demikian perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm yang memberikan penurunan jumlah *E. coli* terbesar adalah selama 6 menit.

Rerata jumlah awal *E. coli* dalam media susu skim 5% berkisar  $2,15 \times 10^9$  cfu/ml, setelah pemberian kejut medan listrik 2,4 kV/cm selama 4 menit terjadi penurunan jumlah *E. coli* menjadi  $2,05 \times 10^7$  cfu/ml, selama 5 menit menjadi  $1,55 \times 10^7$  cfu/ml, dan selama 6 menit menjadi  $2,00 \times 10^6$  cfu/ml. Masing-masing perlakuan waktu memiliki nilai efektivitas kejut medan listrik terhadap jumlah *E. coli* dalam media susu skim 5% yaitu 21,67% untuk perlakuan 4 menit, 22,85% untuk perlakuan 5 menit, dan 32,40% untuk perlakuan 6 menit. Dengan demikian perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm yang memberikan penurunan jumlah *E. coli* terbesar adalah selama 6 menit.

Memudahkan perhitungan laju penurunan jumlah *E. coli*, maka jumlah *E. coli* sebelum dan sesudah perlakuan diubah dalam bentuk logaritma. Adapun data yang lengkap pada jumlah *E. coli* dalam media LB Broth dan Susu skim 5% serta nilai efektivitasnya dapat dilihat pada lampiran 4.





Gambar 5. Hasil Analisis Ragam (Anova) Terhadap Rerata Logaritma Jumlah *E. coli* Akibat Kejut Listrik Tegangan 2,4 kV/cm.

Hasil analisis ragam terhadap penurunan logaritma jumlah *E. coli* menunjukkan waktu perlakuan (menit) berbeda nyata ( $\alpha = 5\%$ ), sedangkan jika dibandingkan perlakuan yang diterapkan pada media LB Broth dan Susu skim 5% serta interaksi antara kedua faktor juga menghasilkan perbedaan yang nyata terhadap penurunan jumlah *E. coli*, dimana perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm dalam media LB Broth menghasilkan penurunan jumlah *E. coli* lebih besar bila dibandingkan dalam media susu skim 5%. Hal ini dapat dinyatakan bahwa *E. coli* yang ditumbuhkan dalam media susu skim 5% lebih tahan terhadap perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm, hal ini disebabkan karena kandungan ion dalam media susu skim lebih rendah daripada media LB Broth sehingga aliran arus listrik terhalang (Lampiran 3, Tabel 14 dan 15). Tingginya konsentrasi sodium klorida dalam media LB Broth menyebabkan semakin besar aliran listrik yang sampai pada bakteri sehingga meningkatkan kematian *E. coli*. Menurut Insan Sains Project (2007) besarnya konsentrasi ion-ion sodium klorida dalam media, akan meningkatkan konduktansi yaitu kemampuan untuk menghantarkan arus listrik.

Adanya laktosa dalam susu skim juga memberikan perlindungan terhadap *E. coli* akibat kejutan listrik. Kehadiran laktosa kemungkinan memberikan perlindungan *E. coli* dari kejutan listrik, dimana sel yang berdekatan dengan molekul-molekul laktosa akan terlindung dari aliran elektron yang ditimbulkan oleh listrik sehingga memiliki ketahanan hidup yang lebih besar daripada sel yang tidak terlindungi oleh laktosa. Dalam hal ini laktosa merupakan senyawa kimia yang bukan termasuk golongan elektrolit sehingga tidak menghantarkan arus listrik karena molekulnya tidak mengalami ionisasi. Oleh karena itu pengaruhnya sangat besar terhadap *E. coli* dari kejutan listrik. Sedangkan tinjauan dari sifat molekulnya gula bukan merupakan senyawa elektrolit karena molekul-molekul gula tidak mampu terionisasi di dalam air (Bird, 1987).

Berdasarkan hasil penelitian (pada Gambar 5), semakin lama perlakuan kejutan medan listrik, memberikan penurunan jumlah *E. coli* semakin besar. Selain itu, diketahui bahwa pada media LB Broth dan susu skim 5% antar perlakuan waktu berbeda nyata kecuali pada perlakuan waktu 4 dan 5 menit tidak berbeda nyata (ditunjukkan dengan huruf yang sama), hal ini dapat dikatakan bahwa perlakuan kejutan medan listrik 2,4 kV/cm dengan lama kejutan 4 dan 5 menit menghasilkan penurunan jumlah *E. coli* yang sama atau tidak memberikan pengaruh yang berbeda, sehingga lama waktu yang memberikan penurunan jumlah *E. coli* yang terbesar, baik pada media LB Broth maupun susu skim 5% adalah selama 6 menit. Menurut Grahl dkk. 1996 dalam U.S Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition 2000), semakin lama waktu perlakuan, yaitu kombinasi antara jumlah kejutan (*pulse*) dengan lama kejutan maka semakin tinggi penurunan jumlah *E. coli*. Sedangkan nilai efektivitas kejutan medan listrik terhadap jumlah *E. coli* dapat dilihat pada Lampiran 5.

Perlakuan lama waktu kejutan selama 6 menit pada media susu skim 5% menunjukkan hasil penurunan jumlah *E. coli* yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan pada media LB Broth selama 4 dan 5 menit. Hal ini dapat dinyatakan bahwa perlakuan kejutan medan listrik 2,4 kV/cm selama 6 menit pada media susu skim memberikan pengaruh yang sama dengan perlakuan 4 dan 5 menit pada media LB Broth terhadap penurunan jumlah *E. coli*. Pernyataan tersebut sesuai dengan Grahl dkk. 1996 dalam U.S Food and Drug Administration

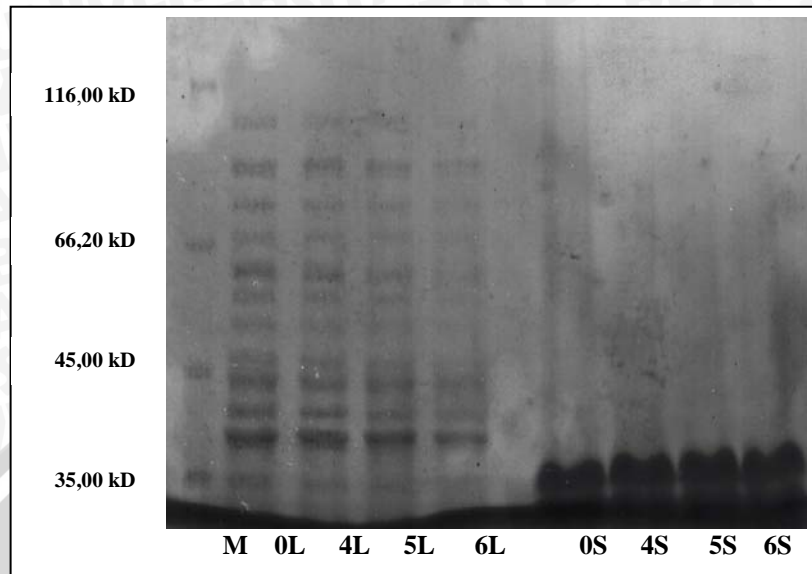
Center for Food Safety and Applied Nutrition 2000), semakin lama waktu perlakuan, yaitu kombinasi antara jumlah kejutan (*pulse*) dengan lama kejutan maka semakin tinggi penurunan jumlah *E. coli*.

Mekanisme kematian yang nyata terhadap *E. coli* dengan adanya perlakuan kejutan listrik bertegangan tinggi diduga dikarenakan terjadi kerusakan dinding sel *E. coli* sehingga menyebabkan menurunnya permeabilitas dari dinding sel dalam mengatur tekanan osmotik sel. Dengan menurunnya permeabilitas dari dinding sel menyebabkan terjadi pemecahan pada membran sel sehingga mengganggu tingkat osmolalitas dari sel. Hal ini didukung dengan pernyataan bahwa kejutan listrik tegangan tinggi menyebabkan membran sel mengalami elektroporasi yaitu fenomena dimana sel mikroba terekspose medan listrik tegangan tinggi yang kemudian merusak lapisan lemak dan protein pada membran sel (Castro dkk. 1990 dalam U. S. Food and Drug Administration 2000). Setelah dikejutkan dengan medan listrik bertegangan tinggi, plasma membran sel menjadi permeabel terhadap air dan molekul kecil sehingga terjadi pembengkakan yang menyebabkan membran sel pecah. Hal ini juga didukung Mizumo dan Hazamizu dalam Gould (1995) bahwa kejutan listrik tegangan tinggi menyebabkan modifikasi permukaan sel dimana dari pengamatannya dengan mikroskop elektron menemukan adanya lubang pada dinding sel, sedangkan pada sel yang tidak dialiri listrik tidak ditemui hal ini.

Membran sel mikroba mempunyai beberapa fungsi untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel, antara lain mengontrol keluar masuknya senyawa-senyawa penting ke dalam sel, mengeluarkan hasil buangan metabolisme dan dalam sintesis dinding sel, mengandung enzim-enzim untuk degradasi makanan serta berperan aktif dalam mengontrol sintesa DNA. Sehingga kerusakan membran sel juga menyebabkan berubahnya fungsi sel dan menghambat terjadinya reproduksi (Fardiaz, 1993).



#### 4.2 Profil Pita Protein *Escherichia coli* Sebelum dan Sesudah Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.



Gambar 6. Pola Pita Protein *Escherichia coli* Sebelum dan Sesudah Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.

Keterangan :

M : Marker

0L : *Escherichia coli* perlakuan 0 menit (kontrol) pada media LB Broth

4L : *Escherichia coli* perlakuan 4 menit pada media LB Broth

5L : *Escherichia coli* perlakuan 5 menit pada media LB Broth

6L : *Escherichia coli* perlakuan 6 menit pada media LB Broth

0S : *Escherichia coli* perlakuan 0 menit (kontrol) pada Susu skim 5%

4S : *Escherichia coli* perlakuan 4 menit pada media Susu skim 5%

5S : *Escherichia coli* perlakuan 5 menit pada media Susu skim 5%

6S : *Escherichia coli* perlakuan 6 menit pada media Susu skim 5%

**Tabel 3. Tabulasi Keberadaan Pita Protein *Escherichia coli* pada Media LB Broth dan Susu Skim 5% Sebelum dan Sesudah Perlakuan Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm.**

No.	Berat Molekul Pita Protein (kDa)	LB Broth				Susu Skim 5%			
		Lama Kejut Listrik (menit)				Lama Kejut Listrik (menit)			
		0	4	5	6	0	4	5	6
1	33,10	++++	+++	++	+	++++	++++	++++	++++
2	37,41	++++	+++	++	+	-	-	-	-
3	40,44	++++	+++	++	+	-	-	-	-
4	44,33	++++	+++	++	+	-	-	-	-
5	47,89	++++	+++	++	+	-	-	-	-
6	53,28	++++	+++	++	+	-	-	-	-
7	58,42	++++	+++	++	+	-	-	-	-
8	62,17	++++	+++	++	+	-	-	-	-
9	70,31	++++	+++	++	+	-	-	-	-
10	77,08	++++	+++	++	+	-	-	-	-
11	87,18	++++	+++	++	+	-	-	-	-
12	101,57	++++	+++	++	+	-	-	-	-

**Keterangan : " + " = Menunjukkan tingkat ketebalan pita protein  
 " - " = Profil pita protein yang tidak dimiliki**

Jumlah sel dan kadar protein *E. coli* pada masing-masing media dan perlakuan lama waktu kejut medan listrik 2,4 kV/cm dapat dilihat pada Lampiran 7. Berdasarkan berat molekulnya, dengan kadar protein sebesar 0,036 mg/ml yang dimasukkan dalam masing-masing sumuran, pita protein yang diperoleh dari hasil elektroforesis menunjukkan adanya 12 macam protein *E. coli*.

Hasil penelitian yang diperoleh pada Gambar 6 dan Tabel 3, menunjukkan pita protein *E. coli* yang dihasilkan pada media LB Broth lebih banyak daripada media susu skim 5%. Pada media susu skim 5% hanya terdapat satu pita protein yang dihasilkan yaitu dengan berat molekul 33,10 kDa. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan karakteristik pita protein antara media tumbuh LB Broth dan susu skim 5%, dengan demikian ekspresi protein *E. coli* dipengaruhi oleh faktor eksternal yaitu media tumbuh bakteri. Menurut Raven (2005), perubahan pada lingkungan dimana bakteri tumbuh, sering menghasilkan perubahan pada ekspresi gen. Selain itu LB Broth merupakan media yang baik untuk pertumbuhan *E. coli* dan banyak digunakan untuk aplikasi biologi molekular. Hal ini didukung oleh pernyataan Sigma Aldrich (2007) LB Broth merupakan media standar yang sering digunakan untuk aplikasi kloning, pemurnian plasmid, dan ekspresi protein. Selain itu media LB Broth juga digunakan sebagai media kultivasi *Escherichia coli*. Untuk selanjutnya yang akan dibahas adalah pengaruh kejut medan listrik terhadap profil protein *E. coli* pada media LB Broth saja.

Perlakuan kejut medan listrik 2,4 kV/cm memberikan pengaruh terhadap profil pita protein *E. coli*. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 3, menunjukkan perlakuan kejutan selama 4, 5, dan 6 menit menghasilkan profil pita protein yang semakin lama waktu perlakuan semakin tipis bila dibandingkan dengan profil pita protein 0 menit (kontrol), hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu perlakuan semakin menurun kadar proteinnya. Kemungkinan fenomena ini disebabkan oleh adanya arus listrik akan mengakibatkan gangguan metabolisme sel dan kelainan ekspresi genetik, dimana salah satu diantaranya adalah penurunan ekspresi protein tertentu yang terdapat pada sitoplasma *E. coli*. Perlakuan kejutan listrik dapat menurunkan permeabilitas dinding sel *E. coli* dalam mengatur tekanan osmotik sel. Dengan menurunnya permeabilitas dari dinding sel menyebabkan terjadi pemecahan pada

membran sel sehingga mengganggu tingkat osmolaritas dari sel. Gangguan ini diduga menyebabkan dehidrasi dari sel sehingga reaksi metabolisme seperti sintesa protein akan terhambat. Penghambatan sintesa protein sel ini terjadi karena air yang terikat sebagai media untuk reaksi kimia maupun enzimatik dalam sel telah berkurang karena dimungkinkan air dalam sel akan mengalami ionisasi menjadi ion  $H^+$  dan  $OH^-$ . Diduga adanya ionisasi ini memberikan pengaruh terhadap peningkatan keasaman dari media sehingga membantu meningkatkan kematian dari *E. coli*. Hal ini didukung dengan pernyataan Lado dkk. (2004) kejutan listrik tegangan tinggi digunakan untuk menginaktifkan mikroorganisme, menurunkan metabolit sel, memanipulasi organel intraselular dan makromolekul.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Perlakuan kejutan medan listrik 2,4 kV/cm dengan waktu 4-6 menit memberikan penurunan jumlah *E. coli* dalam media LB Borth dan Susu skim 5%. Penurunan jumlah *E. coli* yang terkandung dalam media LB Broth adalah dari rerata jumlah awal sebesar  $3,83 \times 10^9$  cfu/ml menjadi sebesar  $2,23 \times 10^6$  cfu/ml;  $1,49 \times 10^6$  cfu/ml dan  $2,15 \times 10^5$  cfu/ml (kejutan listrik 4, 5, dan 6 menit). Sedangkan pada media susu skim 5% terjadi penurunan dari rerata jumlah awal  $2,15 \times 10^9$  cfu/ml menjadi sebesar  $2,05 \times 10^7$  cfu/ml ;  $1,55 \times 10^7$  cfu/ml, dan  $2,00 \times 10^6$  cfu/ml (untuk lama kejutan 4, 5, dan 6 menit). Jika dibandingkan antara kedua media perlakuan, yang memberikan penurunan jumlah *E. coli* terbesar adalah media LB Broth dengan lama kejutan 6 menit.

Semakin lama perlakuan kejutan medan listrik, semakin besar nilai efektivitas dalam menurunkan jumlah *E. coli* dalam media LB Broth yaitu 32,26%, 34,08%, dan 43,05% , pada media susu skim 5% yaitu 21,67%, 22,85%, dan 32,40% untuk lama kejutan 4, 5, dan 6 menit.

Perlakuan kejutan medan listrik 2,4 kV/cm memberikan pengaruh terhadap profil protein *E. coli*, yaitu diantara media LB Broth dan susu skim 5% terdapat perbedaan profil pita protein *E. coli* dengan semakin lama kejutan. Pada media LB Broth selama 6 menit terdapat perubahan yaitu semakin tipis, sedangkan pada susu skim 5% tidak ada perubahan.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh kejutan listrik terhadap inaktivasi dengan jenis mikroba patogen atau non-patogen yang lain pada produk-produk makanan, sehingga memberikan informasi lebih banyak tentang kematian mikroba akibat kejutan medan listrik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, I. Pagan, R. Raso, J. Dan Condon, S. 2002. Enviromental Factors Influencing The Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Electric Field. [Http://www.Cmbl.pl/pdf/vol\\_10-p023.pdf](http://www.Cmbl.pl/pdf/vol_10-p023.pdf). Tanggal akses 27 Agustus 2006.
- Albert B., D. Lewis, J. Raff, M. Roberts K., dan James D.W. 1994. Biologi Molekuler Sel. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Anonymous. 2007. *Escherichia coli*. [Http://www.Safefood.net.au/AudienceHierarchy/TheBugBible/Escherichia+coli.htm](http://www.Safefood.net.au/AudienceHierarchy/TheBugBible/Escherichia+coli.htm). Tanggal akses 26 Juni 2007.
- Canovas Barbosa, G.V., Usha R.P., Enrique P., Barry G. Swanson. 1998. Nonthermal Preservation of Foods. Marcel Dekker. New York.
- Bird, T. 1988. Kimia Fisik Untuk Universitas. PT. Gramedia. Jakarta.
- Buckle, K. A., R. A. Edwards, G. H. Fleet, dan M. Wooton. 1995. Ilmi Pangan. Terjemahan H.Purnomo dan Adiono. UI Press. Jakarta.
- Burden, D. W. dan D.B. Whitney. 1995. Biotechnology Protein to PCR : A Course in Strategies & Lab Techniques. Birkhauser. Boston.
- Caprette, D.R. 2005. Measuring Relative Mobility of Protein Bands. <http://www.ruf.rice.edu/~biolabs/studies/sdspage/rf.html>. Diakses tanggal 1 Juli 2005.
- Chung, H.J, W. Bang, M. A Drake. 2006. Stress Response of *Escherichia coli*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Institute of Food Technologists. Vol 5.

- DCP. 2002. Skim Milk Powder. <http://www.milkingredients.ca/DCP>. Tanggal akses 26 September 2006.
- Davis. 2007. Milk Quality Terms. <http://drinc.ucdavis.edu/htm>. Tanggal akses 6 Desember 2006.
- Dwidjoseputro. 1998. Dasar-dasar Mikrobiologi, edisi – 13. Penerbit Djambatan. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Fatchiyah, M.Kes. PhD, DR. Ir. Estri Laras Arumingtyas, MSc. St, Dr. Sri Widyarti, Msi, DR. Sri Rahayu, M.Kes. 2006. Analisa Biologi Molekuler. Isolasi DNA, PCR & RFLP, SDS-PAGE, Immunoblotting & Isoenzym. Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Malang.
- Feng, P. dan Stephen D. Weagant. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* [Http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam\\_4a.html](Http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam_4a.html). Tanggal akses 26 Juni 2007.
- Fennema, O.R. 1996. Food Chemistry. University of Wincosin, Madison, Wincosin. New York.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Castilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N.R. Krieg, dan G.B Philips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. ASM. Washington DC.
- Gould, G.W. 1995. New Methods Food Preservatiev. Chapman and Hall. New York. London.
- Hadiwiyoto, P. 1994. Teknik Uji Mutu Susu dan Hasil Olahannya (Teori dan Praktek). Liberty. Yogyakarta.
- Holt, J.G, Noel, R.K, Peter H. AS, James T.L, dan Stanley T.W. 2000. Determine of Bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

Hames, B. D. 1998. Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach. Third Edition. Oxford University Press. Oxford.

Insan Sains Project. 2007. Kelistrikan. [Http://www.insansainsproject.wordpress.com/tds\\_meter](http://www.insansainsproject.wordpress.com/tds_meter). Tanggal akses 25 Januari 2008.

Lado, B.H., Joshua A.B., C. Patrick Dunne, dan Ahmed E Yousef. 2004. Pulsed Electric field Alters Molecular Chaperone Expression and Sensitizes *Listeria monocytogenes* to Heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4) : 2289-2295

Lefers, M. 2004. Molecular Chaperone. [Http://www.biochem.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions?Def\\_M/molecular\\_chaperone.html](http://www.biochem.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions?Def_M/molecular_chaperone.html). Tanggal akses 3 Juli 2007.

Martin O., B.L. Qin, F.J. Chang, G.V. Barbosa-Canovas, B.G. Swanson. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in Skim Milk by High Intensity Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Process Engineering* 20 (4), 317336. doi: 10. 1111/ j.174545 30. 1997. tb0 0425.x

McKee, T dan J.R McKee. 2003. Biochemistry The Molecular Basis of Life. McGraw Hill. New York.

Miller J.H. 2002. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory. [Http://www.LB\\_Broth-Miller.com/htm](http://www.LB_Broth-Miller.com/htm). Tanggal akses 25 Januari 2008.

Pelczar, M.J., Chan E.C.S. 1988. Microbiology. McGraw Hill. New Delhi.

Ramaswamy, R., Tony Jin, V. M. (Bala) Balasubramaniam, Howard Zhang. 2005. Pulsed Electric Field Processing Fact Sheet for Food Processors. [Http://www.Ohioline.osu.edu/pef.htm](http://www.Ohioline.osu.edu/pef.htm). Tanggal akses 11 September 2006.



- Raven, P.H, George B.J, Jonathan B.L, Susan R.S. 2005. Biology. Seventh Edition. McGraw Hill. New York.
- Rowan, N.J ; Scott J.M ; John G.A ; Douglas C ; Owen F. 2000. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by Pulsed Electric Fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (6) : 2833–2836.
- Rybicki Ed dan Maud Purves. 2006. SDS Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). [Http://www. Mcb. Uct. Ac. Za/SDS-PAGE.Html](http://www.Mcb.Uct.Ac.Za/SDS-PAGE.Html). Tanggal akses 6 Nopember 2006.
- Saifudin M.R dan Dwi Astuti. 2005. Kombinasi Media Filter Untuk Menurunkan Kadar Besi (Fe). *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi.* 6 (1) : 49-64.
- Sigma Aldrich. 2007. Luria Bertani (Miller). [Http://www. Sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_interest/Life\\_Science.html](http://www.Sigmaaldrich.com/Area_of_interest/Life_Science.html). Tanggal akses 13 Desember 2007.
- Simanjuntak, C.H., M.A. Hasibuan, L.O. Siregar, dan Iskak Koiman. 1983. Etiologi Mikrobiologis Penyakit Diare Akut. [Http://www.litbang.Depkes.go.id/Publikasi\\_BPPK/Buletin\\_BPPK/BUL.83A.HTM#A](http://www.litbang.Depkes.go.id/Publikasi_BPPK/Buletin_BPPK/BUL.83A.HTM#A). Tanggal akses 26 Juni 2007.
- Snyder, O.P. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Pathogenic Strains of *E. coli*. [Http://www.hi-tm/escherichia\\_coli\\_O157:H7 and Other Pathogenic Strains of E. coli](http://www.hi-tm/escherichia_coli_O157:H7_and_Other_Pathogenic_Strains_of_E_coli). Tanggal akses 26 Juni 2007.
- Spreer, E. 1998. Milk and Dairy Product Technology. Marcel Dekker, Inc. United State of America.
- Supardi, I. dan Sukamto. 1999. Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan. Alumni Bandung.
- Sundararaj, S dan An Chi Guo. 2003. About *E.coli*. [Http://www. redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi\\_bin/CCDB\\_E.coli.cgi](http://www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi_bin/CCDB_E.coli.cgi). Tanggal akses 20 Oktober 2006.

Todar, K. 2002. Patogenic *E.coli*. Http : // www.textbookofbacteriology.net. Tanggal akses 18 Oktober 2006.

Todar, K. 2005. *E. coli* Infections. Http:// www. bact. wisc. edu/themicrobialworld/ E.coli.html. Tanggal akses 3 Agustus 2007.

Triatmodjo, P. 2007. Pola Kuman Penyebab Diare Akut pada Neonatus dan Anak. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta.

U.S.Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2002. Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies Pulsed Electric Fields. Http://www. Cfsan.fda.gov/~comm/ift-toc.htm. Tanggal akses 11 September 2006.

Zarnowsky, R., J. Eichel, T. Lewicka, H. Rozycki, dan S.J. Pietr. 2001. Protein Fingerprinting as A Complementary Tool for The Classification of Pseudomonas Bacteria. Cell. Mol. Bol. Lett. 6:913-923.



## Lampiran 1. Komposisi Bahan yang Digunakan

Tabel 1. Komposisi *Sample Treatment Buffer*

1.	0,125 M Tris-HCl pH 6,8
2.	2 % (w/v) SDS
3.	8% (v/v) Gliserol
4.	0,1% (w/v) Bromophenol Blue
5.	5% (v/v) B-mercaptoetanol

Tabel 2. Komposisi *Separating Gel* 10 % (10 mL)

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	Akuades	4
2.	30% Akrilamid mix	3,3
3.	Lower Gel Buffer	2,5
4.	10% SDS	0,1
5.	10% Amonium Persulfat	0,1
6.	TEMED	0,004

Tabel 3. Komposisi *Stacking Gel* 5% (3 mL)

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	Akuades	2,1
2.	30% Akrilamid mix	0,5
3.	Upper Gel Buffer	0,38
4.	10% SDS	0,03
5.	10% Amonium Persulfat	0,03
6.	TEMED	0,003

Tabel 4. Stok Akrilamid (30% akrilamid, 0,8% bisakrilamid)

No.	Bahan	Jumlah
1.	Akrilamid	7,5 g
2.	Bisakrilamid	0,2 g
3.	Akuades	25 mL

Tabel 5. Komposisi *Lower Gel Buffer*

No.	Larutan Stok	Volume (mL)	Konsentrasi Akhir
1.	2 M Tris-HCl pH 8,8	7,5	1,5 M
2.	10% SDS	0,4	0,4%
3.	Akuades	2,1	-
Total volume		10	-

Tabel 6. Komposisi *Upper Gel Buffer*

No.	Larutan Stok	Volume (mL)	Konsentrasi Akhir
1.	1 M Tris-HCl pH 6,8	5	0,5 M
2.	10% SDS	0,4	0,40%
3.	Akuades	4,6	-
Total volume		10	-

Tabel 7. Amonium persulfat 10 %

No.	Bahan	Jumlah
1.	Amonium persulfat	0,1 g
2.	Akuades	1 mL

Tabel 8. Komposisi *Running Buffer* pH 8,3

No.	Bahan	Jumlah	Konsentrasi Akhir
1.	Tris	1,5 g	25 mM
2.	Glisin	7,2 g	192 mM
3.	SDS	0,5 g	0,10%
4.	Akuades	500 mL	-

**Lampiran 2. Komposisi Staining dan Destaining Solution**

Tabel 9. Larutan I

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	Isopropanol	10
2.	Asam asetat glasial	30
3.	Akuades	60
	Total volume	100

Tabel 10. Larutan II

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	Metanol	30
2.	Asam asetat glasial	10
3.	Akuades	60
	Total volume	100

Tabel 11. Larutan III (*Coomasive Brilliant Blue R-250 1%*)

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	<i>Coomasive Brilliant Blue R-250</i>	0,5 g
2.	Akuades	50

Tabel 12. Komposisi *Destaining Solution*

No.	Bahan	Volume (mL)
1.	Metanol	30
2.	Asam asetat glasial	10
3.	Akuades	60
	Total volume	100

### Lampiran 3. Komposisi media yang digunakan

Tabel 13. *MacConkey Agar* MERCK Oxoid (gram/Liter)

Komponen	Jumlah
Pepton	20 gram
Laktosa	10 gram
Garam bile	5 gram
Sodium klorida	5 gram
Merah netral	0,075 gram
Agar	12 gram

Tabel 14. Komposisi media LB Broth (Miller) MERCK KGaA (per 1000 mL)

Komponen	Jumlah
Pancreatic digest	10 gram
Ekstrak khamir	5 gram
Sodium klorida	10 gram

Sumber : Miller (2002)

Tabel 15. Komposisi media Susu skim 5% (Anlene Gold)

Komponen	Jumlah per 100 gram
Lemak total	0,8 gram
Protein	33,3 gram
Karbohidrat total	53,2 gram
Natrium	330 mg
Kalium	1470 mg
Kalsium	2400 mg
Fosfor	880 mg
Magnesium	110 mg
Seng	3,8 mg
Iodium	42 µg

Sumber : Anlene (2007).

**Lampiran 4. Data Jumlah *Escherichia coli* Sebelum dan Sesudah Perlakuan Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm**

Tabel 16. Jumlah *E. coli* dalam media LB Broth (cfu/ml)

Perlakuan	Ulangan			RERATA
	I	II	III	
Kontrol	$2,87 \times 10^9$	$1,61 \times 10^9$	$2,80 \times 10^9$	$2,42 \times 10^9$
4 menit	$2,22 \times 10^6$	$2,27 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$2,23 \times 10^6$
5 menit	$1,47 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6$	$1,49 \times 10^6$
6 menit	$2,15 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$	$2,16 \times 10^5$	$2,15 \times 10^5$

Tabel 17. Jumlah *E. coli* dalam media Susu skim 5% (cfu/ml)

Perlakuan	Ulangan			RERATA
	I	II	III	
Kontrol	$2,17 \times 10^9$	$2,13 \times 10^9$	$2,16 \times 10^9$	$2,15 \times 10^9$
4 menit	$2,02 \times 10^7$	$2,10 \times 10^7$	$2,02 \times 10^7$	$2,05 \times 10^7$
5 menit	$1,53 \times 10^7$	$1,59 \times 10^7$	$1,53 \times 10^7$	$1,55 \times 10^7$
6 menit	$1,98 \times 10^6$	$2,01 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$

Tabel 18. Data Logaritma Jumlah *E. coli* Sebelum dan Sesudah Perlakuan Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm

Lama Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm (menit)		Logaritma Jumlah <i>E. coli</i>		
		Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
LB Broth	0	9,45	9,20	9,44
	4	6,34	6,35	6,34
	5	6,16	6,18	6,17
	6	5,33	5,33	5,33
Susu Skim 5%	0	9,33	9,32	9,33
	4	7,30	7,32	7,30
	5	7,18	7,20	7,18
	6	6,29	6,30	6,30

Tabel 19. Rerata Logaritma Jumlah *E. coli* Akibat Perlakuan Metode Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm

Lama Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm (menit)		Rerata Logaritma <i>E. coli</i>
LB Broth	0	9,36 d
	4	6,34 b
	5	6,17 b
	6	5,33 a
Susu Skim 5%	0	9,32 d
	4	7,30 c
	5	7,19 c
	6	6,30 b

Keterangan : Angka pada kolom yang sama dengan notasi huruf yang berbeda berarti berbeda nyata pada uji BNJ 5%

Tabel 20. Nilai Efektivitas (%) Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm

Lama Kejut Listrik (menit)	Nilai Efektivitas Kejut Medan Listrik
	LB Broth (%)      Susu skim 5% (%)
4	32,26      21,67
5	34,08      22,85
6	43,05      32,40

$$\text{Nilai Efektivitas} = \frac{\sum \text{bakteri Awal (Log cfu/ml)} - \sum \text{Akhir (Log cfu/ml)}}{\sum \text{Awal (Log cfu/ml)}} \times 100\%$$

(Saifudin dan Dwi, 2005).



Lampiran 5. Hasil Analisis Data SPSS 12.0

Tabel 21. Diskriptif Statistik Anova

Media	Waktu	Mean	Std. Deviasi	N
LB Broth	0 menit	9,3633333	0,141539	3
	4 menit	6,3433333	0,005774	3
	5 menit	6,17	0,01	3
	6 menit	5,33	0	3
	Total	6,8016667	1,596911	12
Susu skim 5%	0 menit	9,3266667	0,005774	3
	4 menit	7,3066667	0,011547	3
	5 menit	7,1866667	0,011547	3
	6 menit	6,2966667	0,005774	3
	Total	7,5291667	1,158027	12
Total	0 menit	9,345	0,091815	6
	4 menit	6,825	0,527703	6
	5 menit	6,6783333	0,556935	6
	6 menit	5,8133333	0,529478	6
	Total	7,1654167	1,413878	24

Tabel 22 . Hasil Uji Pengaruh Antara 2 Faktor Media dan Waktu

Model	Type III Rata-rata	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1553633,2 (a)	7	221947,6	309,015	,000
Intercept	4158070,8	1	4158070,8	5789,236	,000
Ulangan	,339	1	,339	,000	,983
Media	37099,2	1	37099,21	51,653	,000
Waktu	1479510,9	3	493170,3	686,636	,000
Media * Waktu	37023,1	3	12341,040	17,182	,000
Error	11491,8	16	718,242		
Total	5723195,9	24			
Corrected Total	1565125,1	23			

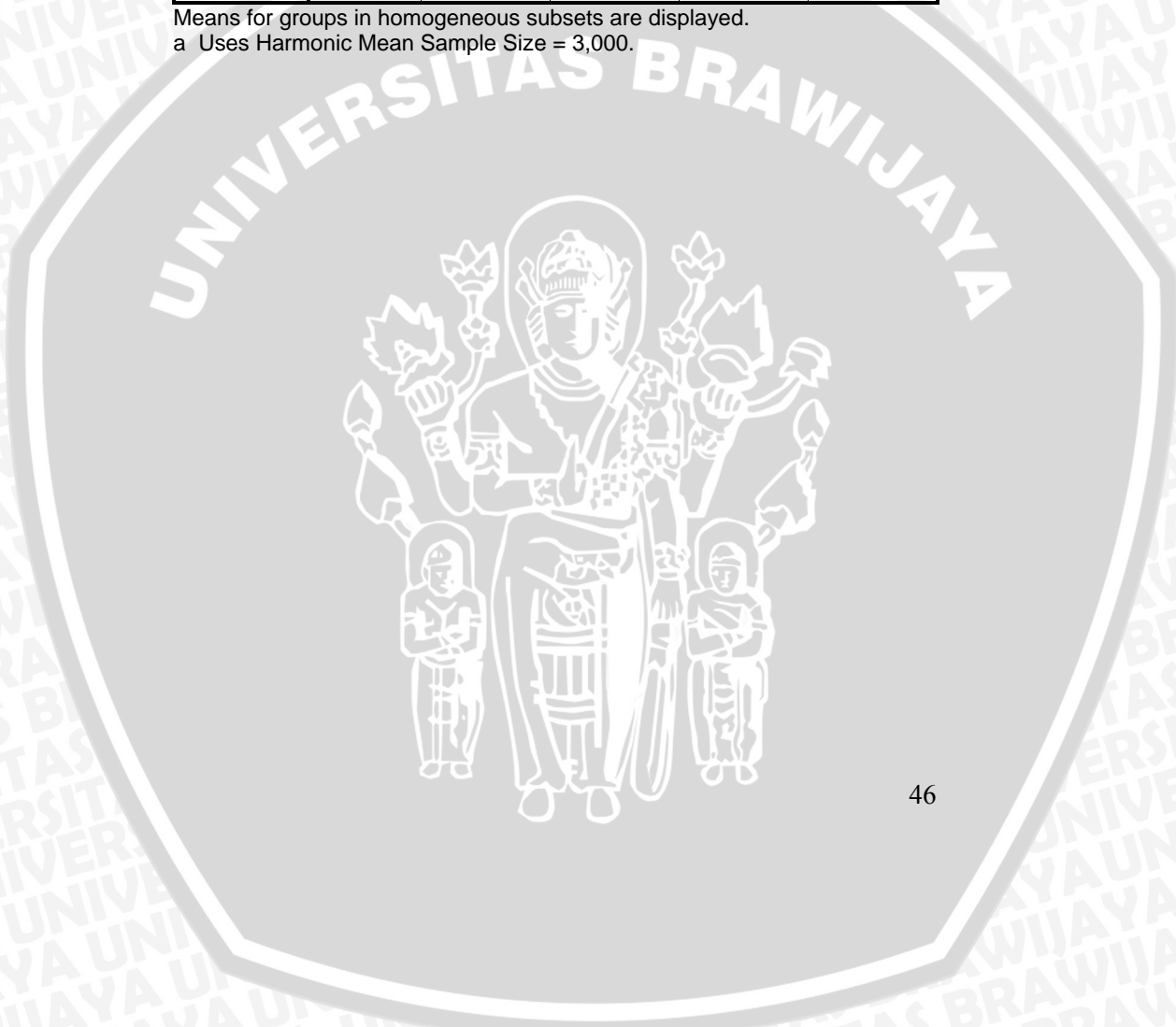
a R Squared = ,993 (Adjusted R Squared = ,989)

Tabel 23. Hasil Analisis BNJ (5%)

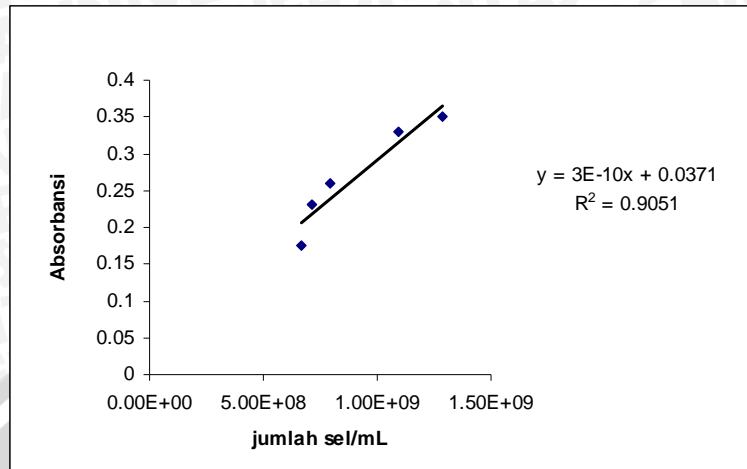
Interaksi	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
M1W4	3	151,4194			
M1W3	3		234,8863		
M2W4	3		249,6507		
M1W2	3		255,2427		
M2W3	3			371,1802	
M2W2	3			390,0857	
M2W1	3				811,2967
M1W1	3				821.2763
Sig.		1,000	.568	.648	.978

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

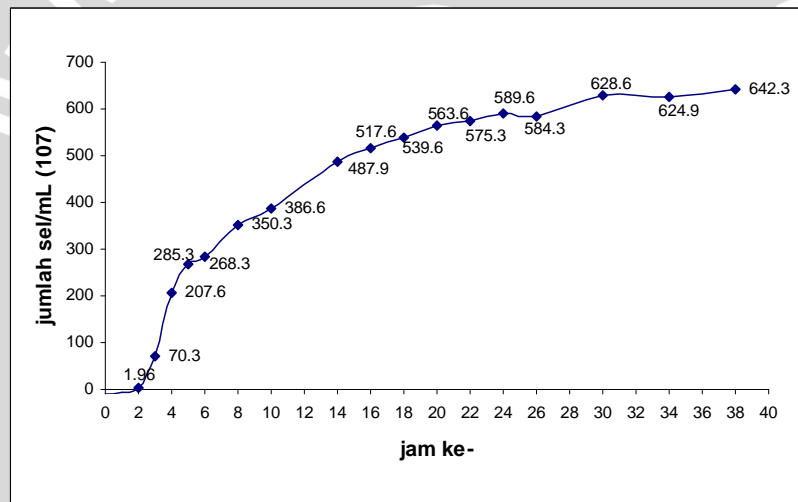
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



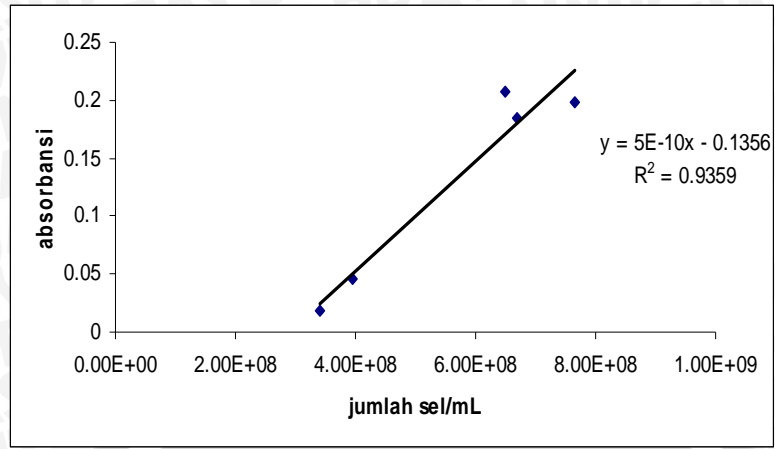
Lampiran 6. Kurva Standar dan Kurva Pertumbuhan *Escherichia coli* dalam media LB Broth dan Susu skim 5%



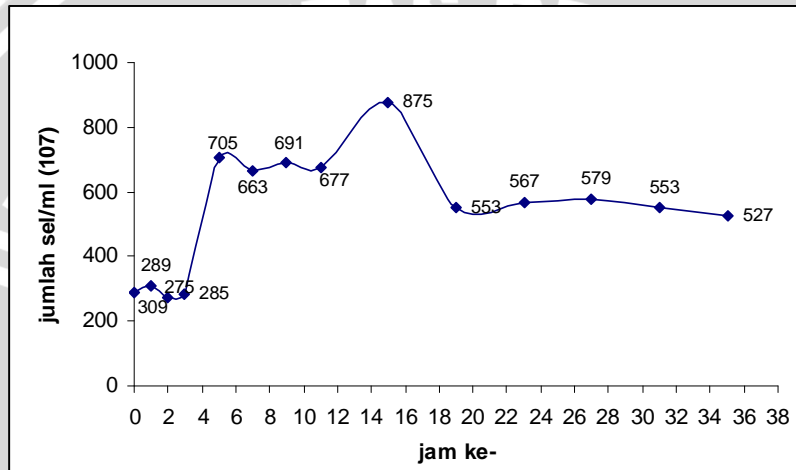
Gambar 1. Kurva standar *E. coli* dalam media LB Broth



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *E. coli* dalam media LB Broth



Gambar 3. Kurva standar *E. coli* dalam media Susu skim 5%

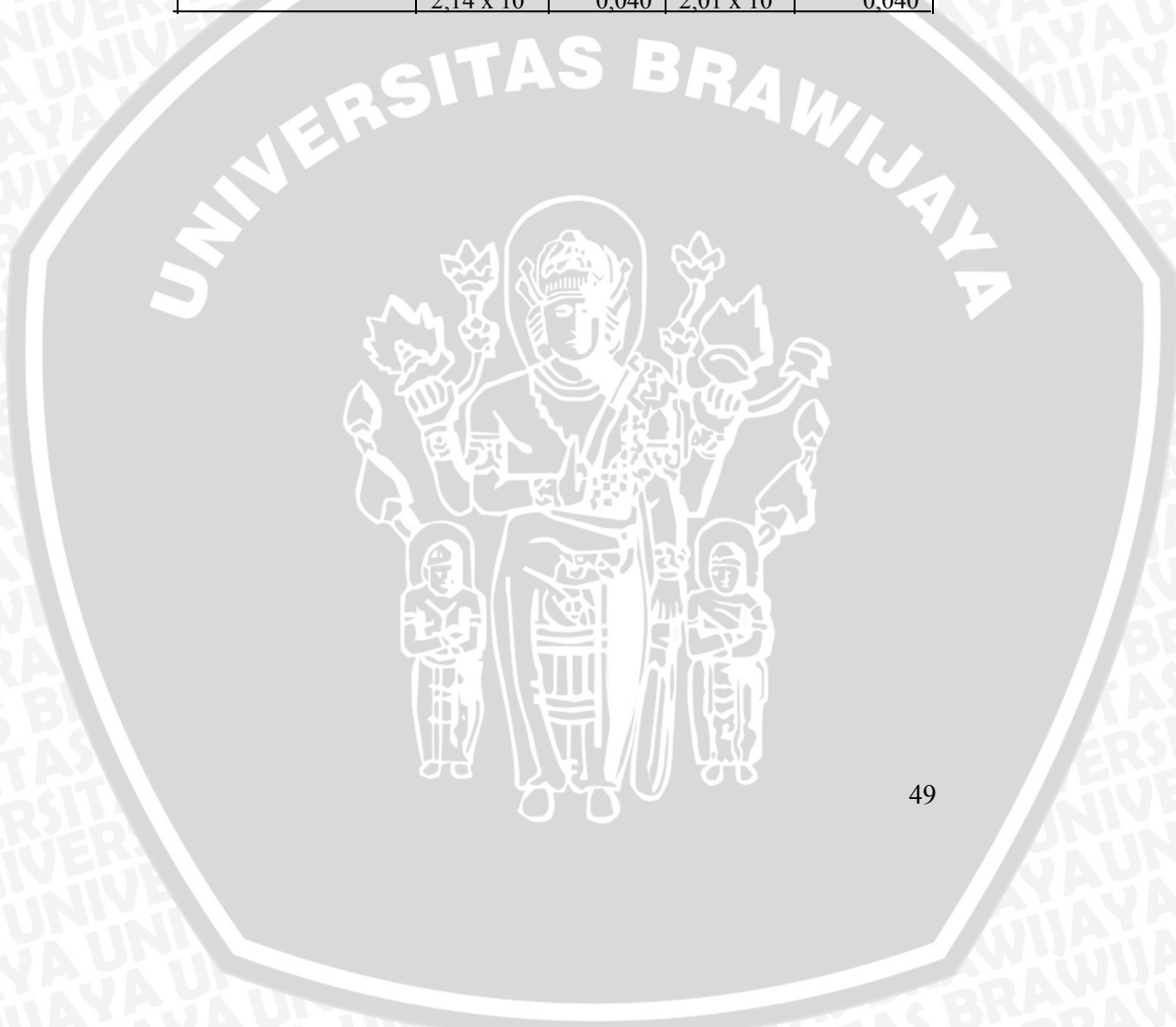


Gambar 4. Kurva pertumbuhan *E. coli* dalam media Susu skim 5%

**Lampiran 7. Jumlah sel dan Kadar Protein *Escherichia coli***

Tabel 24. Jumlah sel dan Kadar Protein *Escherichia coli*

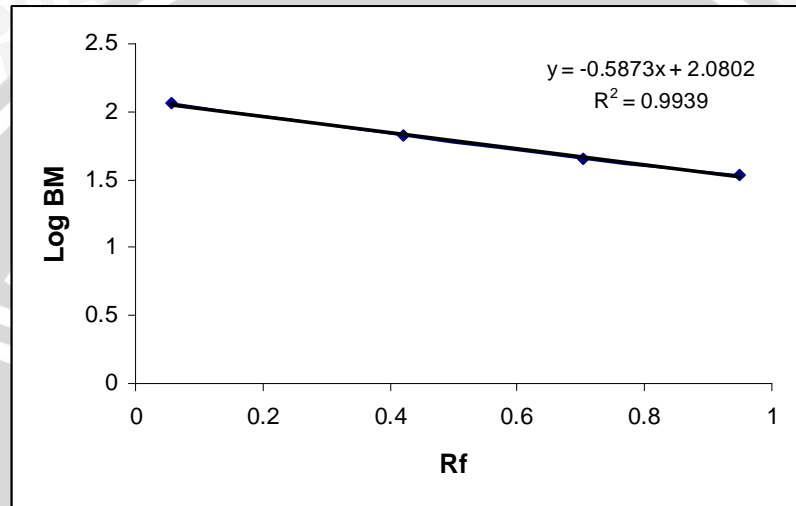
Perlakuan (menit)	Media		Susu Skim 5%	
	LB	Broth	Jumlah <i>E.coli</i> (cfu/ml)	Kadar Protein (mg/ml)
0	1,61 x 10 <sup>9</sup>	0,040	2,13 x 10 <sup>9</sup>	0,040
4	2,27 x 10 <sup>6</sup>	0,036	2,10 x 10 <sup>7</sup>	0,040
5	1,52 x 10 <sup>6</sup>	0,036	1,59 x 10 <sup>7</sup>	0,036
6	2,14 x 10 <sup>5</sup>	0,040	2,01 x 10 <sup>6</sup>	0,040



Lampiran 8. Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul Protein

Tabel 25. Berat Molekul dan Mobilitas Protein Standar

Protein	Berat Molekul (kDa)	Rf (x)	Log Berat Molekul (y)
β- Galaktosidase	116	0,056	2,06
Bovine Serum Albumin	66,20	0,420	1,82
Ovalbumin	44	0,704	1,65
Lactate dehidrogenase	35	0,954	1,54



Gambar 5. Kurva Standar Berat Molekul Protein

### Lampiran 9. Diagram Alir Metode Penelitian

Diagram Alir 1. Preparasi *Escherichia coli* dalam media LB Broth dan Susu Skim 5%

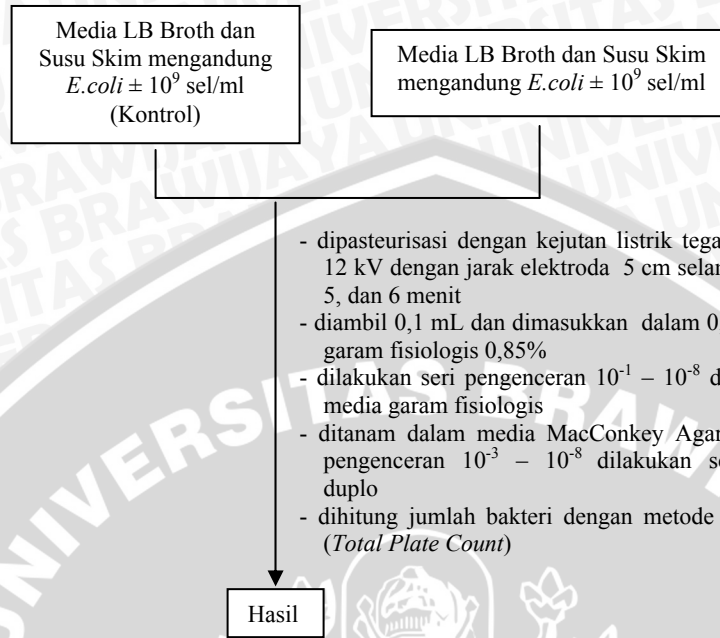
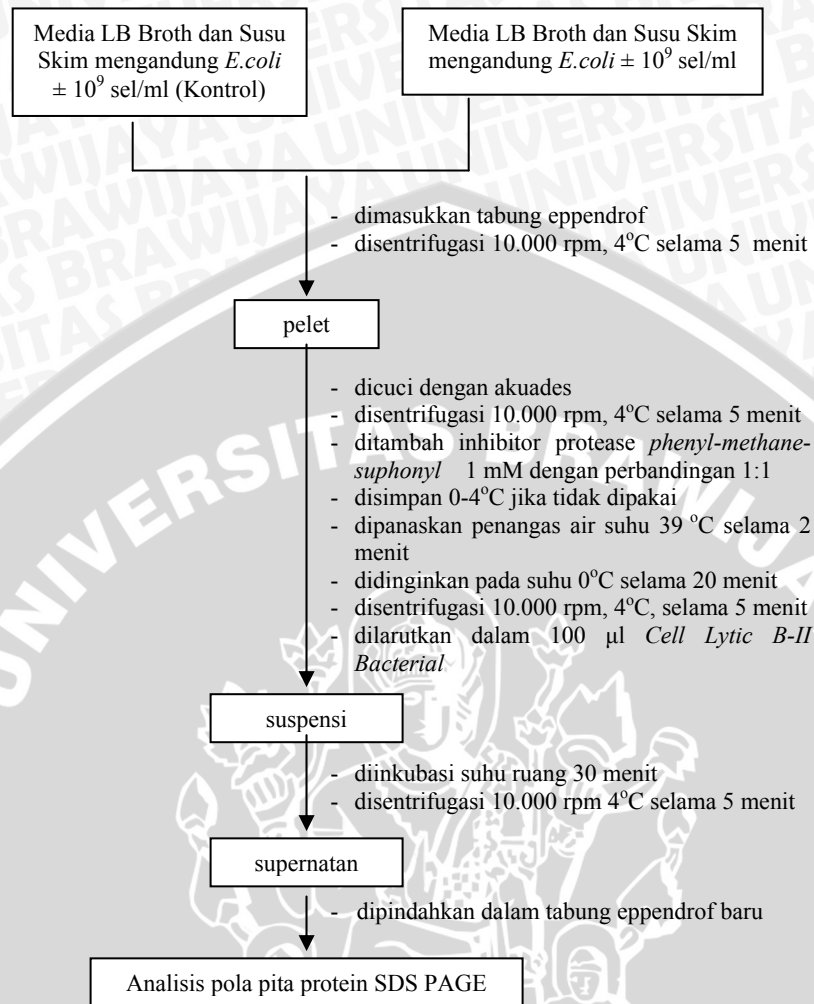


Diagram Alir 2. Ekstraksi protein *Escherichia coli* dalam media LB Broth dan Susu Skim 5%





## Diagram Alir 3. Analisis Pola Pita Protein dengan SDS-PAGE

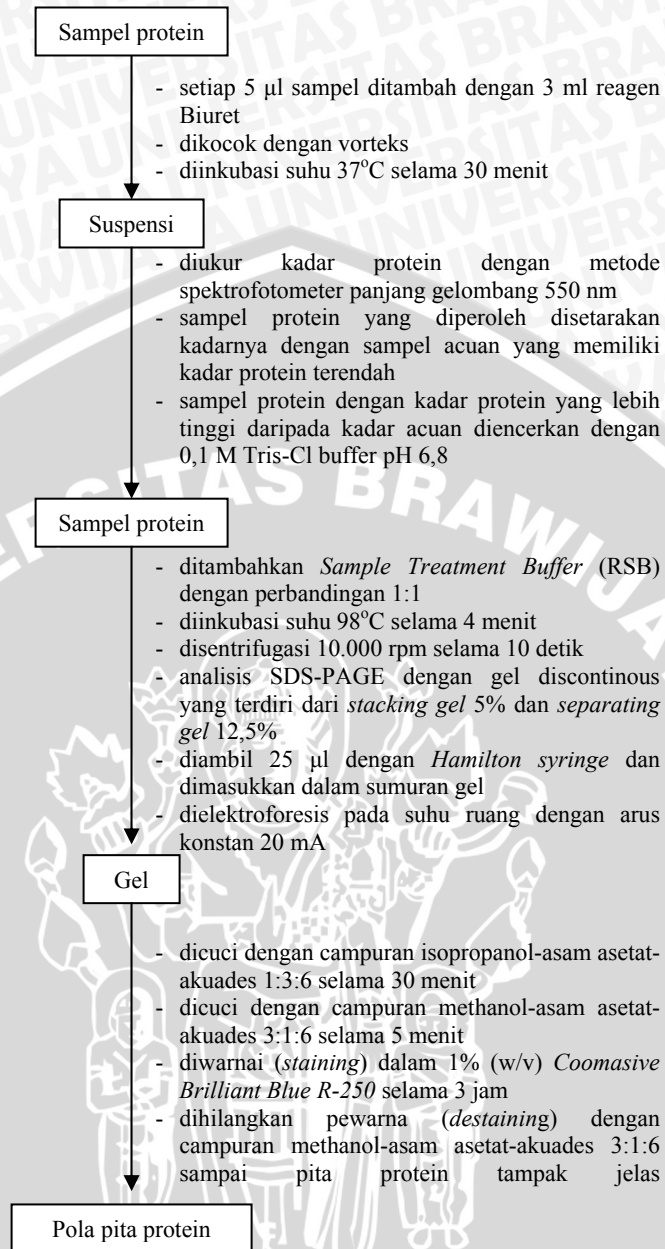
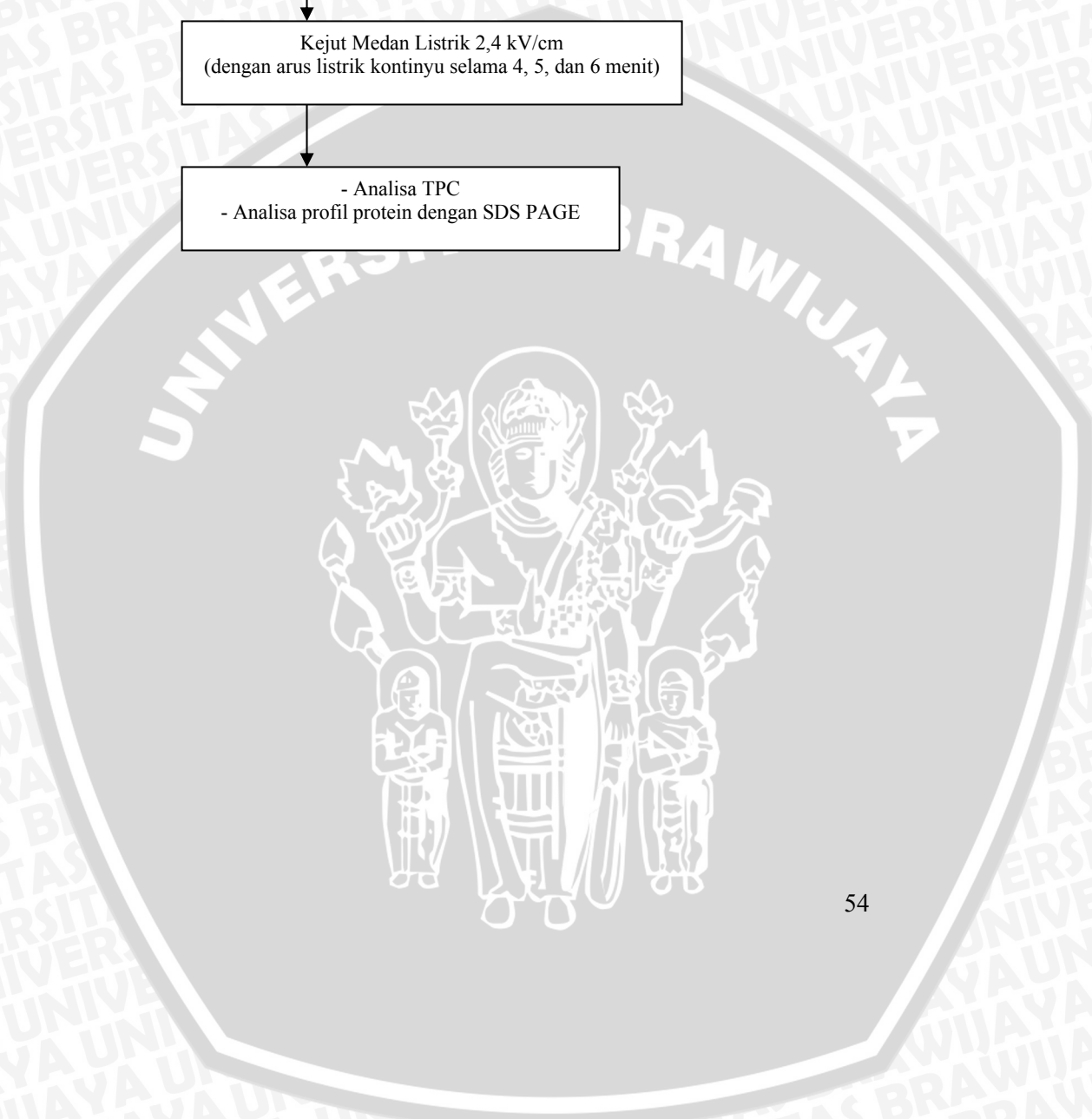
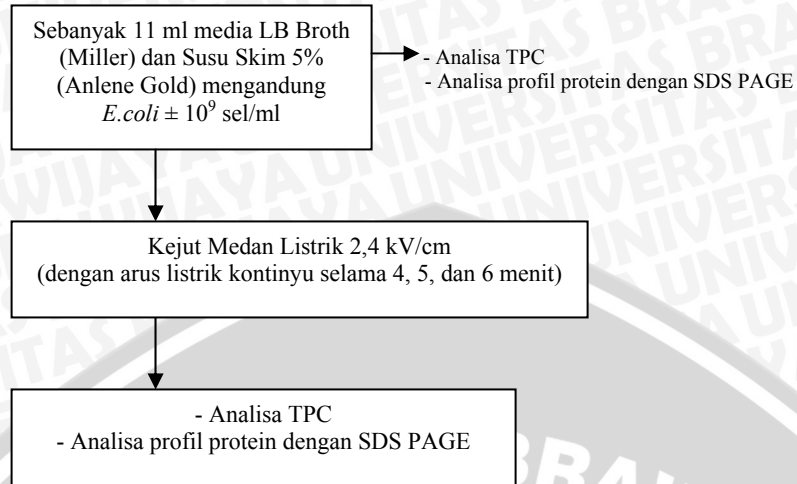


Diagram Alir 4. Proses Kejut Medan Listrik



Lampiran 10. Alat Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm



Gambar 6. Alat Kejut Medan Listrik 2,4 kV/cm



Gambar 7. Alat Kejut Listrik dalam Laminar Air Flow (LAF)



Gambar 8. Ruang UV untuk Sterilisasi Alat Kejut Listrik







