

Repository Universitas Brawijaya
KARAKTERISASI BAKTERIOSIN *Lactobacillus casei* DALAM
MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN
(*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*)



LAPORAN TESIS
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

AMIDYA NUGRAHANI

NIM. 116080117011002

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT BIOTEKNOLOGI PERIKANAN DAN KELAUTAN

PROGRAM PASCASARJANA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016



Repository Universitas Brawijaya

LAPORAN

TESIS

KARAKTERISASI BAKTERIOSIN *Lactobacillus casei* DALAM

(*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*)

MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN

Oleh :

AMIDYA NUGRAHANI

NIM: 116080117011002

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 15 Januari 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Ketua

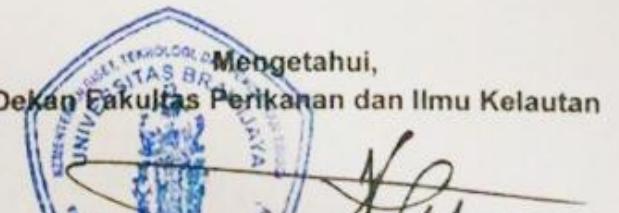
Dr. Ir. Hardoko, MS.

NIP. 19620108 198802 1 001

Anggota

Dr. Ir. Anik Martinah H., MSc

NIP. 1961310 198701 2 001



Mengetahui,

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

NIP. 19591230 198503 2 002

JUDUL TESIS :

KARAKTERISASI BAKTERIOSIN *Lactobacillus casei* DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN (*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp* dan *Staphylococcus sp*)

Nama Mahasiswa

: Amidya Nugrahani

NIM

: 116080117011002

Program Studi

: Budidaya Perairan

Minat

: Bioteknologi Perikanan dan Kelautan

KOMISI PEMBIMBING

Ketua

: Dr. Ir. Hardoko, MS

Anggota

: Dr. Ir. Anik Martinah H, M.Sc

PENGUJI

Penguji I

: Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

Penguji II

: Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Tanggal Ujian Tesis

: 15 Januari 2016

SK Penguji

:

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 15 Januari 2016
Mahasiswa



Amidya Nugrahani
NIM. 116080117011002



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Ponorogo, pada tanggal 21 September 1990. Penulis adalah anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Nugroho Rahardjo dan Susiam Mulyantiningsing. Riwayat pendidikan penulis dimulai dari SDN Sidokare 2 Sidoarjo, pada tahun 1996-2002. Penulis melanjutkan pendidikan di SLTPN 5 Sidoarjo dan lulus pada tahun 2005. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMAN 2 Sidoarjo, dan lulus pada tahun 2008. Setelah selesai dibangku SMA, penulis melanjutkan pendidikan dibangku kuliah dan diterima di salah satu universitas di Indonesia yaitu Universitas Brawijaya. Penulis diterima di Universitas Brawijaya pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2008 melalui jalur PSB (Penjaringan Siswa Berprestasi).

Selama menjadi mahasiswa di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, penulis mempunyai beberapa pengalaman sebagai asisten praktikum pada beberapa mata kuliah yaitu Kimia Dasar, Biokimia Perikanan, Teknologi Pengemasan, Teknik Refrigerasi, Teknik Limbah Ikan, dan Teknologi Pasca panen.

Penulis melakukan penelitian skripsi dengan judul "Pengaruh Penambahan Residu Daging Ikan Dari Ekstraksi Albumin Ikan Gabus (*Ophiocephalus Striatus*) Terhadap Sifat Kimia Dan Organoleptik Pada Brownies Panggang" di bawah bimbingan Bapak Prof. Dr. Ir. Eddy Suprayitno, MS dan Ibu Ir. Titik Dwi Sulistiati, MP. Penulis melanjutkan pendidikan Magister di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Program Studi Budidaya Perairan pada tahun 2011-2015 melalui program fast tract. Penulis melakukan penelitian tesis dengan judul "Karakterisasi Bakteriosin *Lactobacillus casei* Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Pembentuk Histamin (*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp* dan *Staphylococcus sp*)" di bawah bimbingan Bapak Dr. Hardoko, MS. dan Ibu Dr. Ir. Anik Martinah H, M.Sc.

Malang, 15 Januari 2016

Penulis



UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis pada kesempatan ini menyampaikan ucapan terima kasih yang

sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT, yang telah memberikan kemudahan, kelancaran dalam penyelesaian tesis dan kesehatan bagi saya ;
2. Bapak Dr. Ir. Hardoko, MS selaku Komisi pembimbing yang tiada hentinya membimbing, memberikan kritik dan saran yang membangun kepada saya dengan sabar demi kesempurnaan penelitian saya ;
3. Ibu Dr. Ir. Anik M. Hariati, M.Sc selaku anggota pembimbing yang membimbing dan mengarahkan serta memotivasi demi terselesaikannya laporan tesis saya. Saya ucapkan terimakasih banyak ;
4. Bapak Dr. Ir. Happy Nursyam, MS dan Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen pengujii, terimakasih atas kritik dan saran yang diberikan ;
5. Kedua orang tua saya dan kedua adik saya yang memberikan dukungan yang tiada hentinya, motivasi dan do'a yang tiada putusnya ;
6. Mbak Titin Yuniastik selaku teknisi laboran di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Mbak Suci selaku teknisi laboran di Laboratorium Biologi dan Medikal (Biomedik) Fakultas Kedokteran, Mbak Fitria selaku teknisi laboran di Laboratorium Sentral dan Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian tesis ini ;
7. Teman-teman *Fast Track* 2011 (Heni, Atis, Anisa, Johannida, Desy, I'ah dan Baruna), teman – teman Pasca Reguler 2014 (mb Tya, pak Damang, lit, Rani, Lusi,) serta teman – teman Balai Karantina Ikan Surabaya II Tanjung Perak (bu siti, puput, adi, mb ning, pak didin, pak zaki dan masih banyak lagi) yang membantu dan memberikan dukungan serta motivasinya.
8. Teman – teman kos kertosentono 101 (mb ninik, vina, ana, mala dan masih banyak lagi) yang telah banyak membantu dan memberikan motivasi dalam penyelesaian tesis ini.

AIMIDA NUGRAHANI (NIM 116080117011002). Karakterisasi Bakteriosin *Lactobacillus casei* Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Pembentuk Histamin (*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*). Komisi Pembimbing, Ketua: Dr. Ir. Hardoko, MS, Anggota : Dr. Ir. Anik Martinah H., MSc

RINGKASAN

Ikan tongkol yang tergolong famili *scombroideae* jika dibiarkan pada suhu kamar, maka segera akan terjadi proses pembusukan serta kandungan air yang cukup tinggi pada tubuh ikan juga merupakan media yang cocok untuk kehidupan atau pertumbuhan bakteri pembusuk atau mikroorganisme yang lain, sehingga ikan sangat cepat mengalami proses pembusukan dan menjadi tidak segar lagi. Jika ikan tongkol yang telah mengalami proses pembusukan ini dikonsumsi akan menyebabkan keracunan. Keracunan disebabkan oleh kontaminasi bakteri pathogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacteriaceae* dan lain-lain. Keracunan yang sering terjadi pada ikan tongkol yaitu keracunan histamin (*scombroid fish poisoning*).

Proses pembentukan histamin pada ikan sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim *L-Histidine Decarboxylase* (HDC). Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim HDC, termasuk kelompok Enterobacteriaceae, misalnya: *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter intermedium*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Morganella morganii*. Untuk menghambat pertumbuhan bakteri ini, perlu dilakukannya tindakan preventif agar dapat memperlambat terjadinya perubahan histidin sehingga tidak menyebabkan alergi. Hal yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan bakteriosin sebagai agen antibakterial. Salah satunya adalah penggunaan bakteriosin sebagai bahan pengawet alami. Diketahui bahwa *Lactobacillus casei* adalah bakteri penghasil bakteriosin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa patogen umum dan mikroorganisme pembusuk makanan dengan produksi bakteriosinnya.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2014 – Desember 2014, di Laboratorium Biologi dan Medikal (Biomedik) Fakultas Kedokteran, Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, dan Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dengan tujuan (1) Mengetahui aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap pertumbuhan bakteri pembentuk histamin; (2) Menentukan stabilitas ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap suhu dan pH; (3) Mendapatkan berat molekul ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* dan (4) Mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin.

Penelitian dilakukan terdiri dari 2 (dua) tahap, yaitu karakterisasi bakteriosin (ekstraksi bakteriosin, pemurnian bakteriosin, dan karakterisasi bakteriosin meliputi stabilitas suhu dan lama pemanasan, pH dan berat molekul bakteriosin) dan aplikasi bakteriosin pada bakteri pembentuk histamin berdasarkan konsentrasi bakteriosin yang berbeda. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini, yaitu ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* mampu menghambat bakteri *Pseudomonas sp*, *Proteus morganii* dan *Micrococcus sp*. Ekstrak

Repository Universitas Brawijaya
bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki stabilitas suhu yang tinggi dimana pada suhu 95 °C masih memiliki aktivitas hambat terhadap bakteri pembentuk histamin. Suhu pemanasan terbaik terletak pada suhu 45°C selama 15 menit. Bakteriosin *Lactobacillus casei* pada bakteri *Pseudomonas sp* mempunyai aktivitas optimum pada pH 5 dengan aktivitas hambat sebesar 8,25 mm, sedangkan pada bakteri *Micrococcus sp* memiliki aktivitas optimum pada pH 4 dengan aktivitas hambat sebesar 9,25 mm. Bakteriosin aktif pada pH asam. Bakteriosine *Lactobacillus casei* memiliki berat molekul 14,34 kDa yang masuk dalam kelompok bakteriosin kelas III, umumnya berukuran besar (>10 kDa), dan tidak tahan panas. Aktivitas hambat cenderung meningkat berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi dalam perlakuan.

Repository Universitas Brawijaya
AIMDYA NUGRAHANI (NIM 116,080,117,011,002). Characterization of Bacteriocin *Lactobacillus casei* to Inhibit the Growth of the Histamine-Forming Bacteria (*Pseudomonas sp*, *Proteus morganii*, *Micrococcus sp* and *Staphylococcus sp*).
Supervisor : Dr. Ir. Hardoko, MS, Co-supervisor : Dr. Ir. Anik Martinah H., MSc.

SUMMARY

Swordfish belonging to the family scombroidei if left at room temperature, then soon there will be a process of decay and moisture content high enough on the fish's body is also a medium that is suitable for life or growth of bacteria or microorganisms else, so the fish very quickly undergo a process of decay and becomes fresh again. If the tuna that have undergone a process of decay is consumed will cause poisoning. Poisoning caused by contamination of pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacteriaceae* and others. Poisoning often occurs on the cob, namely the histamine (*scombroid fish poisoning*).

The process of formation of histamine in fish is influenced by the activity of the enzyme *L-histidine Decarboxylase* (HDC). Various types of bacteria are able to produce the enzyme HDC, including the Enterobacteriaceae, for example: *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter intermedium*, *alvei Hafnia*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Morganella morganii*. To inhibit bacterial growth, it is necessary to do preventive measures in order to slow down the change of histidine so as not to cause allergies. Things can be done by using bacteriocins as an antibacterial agent. One is the use of bacteriocins as a natural preservative. It is known that the bacteria *Lactobacillus casei* is a bacteriocin having antibacterial activity against several common pathogens and spoilage microorganisms bakteriosinya food production.

The research was conducted in January 2014 - December 2014, in the Laboratory of Biology and Biochemistry (Biomedicine) Faculty of Medicine, Laboratory of Disease and Health Fish and Laboratory Center of Biological Sciences Brawijaya University with the purpose of (1) Determine the inhibitory activity extract bacteriocin *Lactobacillus casei* against bacterial growth forming histamine; (2) determine the stability of bacteriocins extract of *Lactobacillus casei* to temperature and pH; (3) Obtain a molecular weight bacteriocins extract of *Lactobacillus casei* and (4) Determine the influence of the extract concentration of *Lactobacillus casei* different bacteriocins in inhibiting histamine-forming bacteria.

The study was conducted consisting of two (2) phases, namely the characterization of bacteriocins (extraction bacteriocins, bacteriocins purification, and characterization of bacteriocins include temperature stability and prolonged heating, pH and molecular weight bacteriocins) and application of bacteriocins on histamine-forming bacteria based on the concentration of different bacteriocins.

The results obtained in this study, namely *Lactobacillus casei* bacteriocins extract is able to inhibit the bacteria *Pseudomonas sp*, *Proteus morganii* and *Micrococcus sp*. *Lactobacillus casei* bacteriocins extract has high temperature stability which at a temperature of 95 °C still has inhibitory activity against histamine-forming bacteria. Best heating temperature is at a temperature of 45 °C for 15 minutes. Bacteriocins of *Lactobacillus casei* bacteria *Pseudomonas sp* has optimum activity at pH 5 with inhibitory activity of 8.25 mm, while the bacteria *Micrococcus sp* has optimum activity at pH 4 with inhibitory activity of 9.25 mm. Bacteriocins active at acidic pH. Bacteriocin *Lactobacillus casei* has a molecular weight of 14.34 kDa were included in the group of class III bacteriocins, generally large (>

10 kDa), and heat inhibitory activity tends to increase proportional to the increase in the concentration of the treatment.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW, sehingga penulis dapat menyajikan Tesis yang berjudul "Karakterisasi Bakteriosin *Lactobacillus casei* Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Pembentuk Histamin (*Pseudomonas sp*, *Proteus morgani*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*)". Tesis ini merupakan salah satu syarat yang diperlukan untuk memperoleh gelar magister (S-2) pada Program Studi Budidaya Perairan, Program Pascasarjana, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan Tesis ini. Penulis berharap semoga Tesis ini dapat bermanfaat dalam menambah pengetahuan dan memberikan informasi bagi pihak-pihak yang berminat dan membutuhkannya.

Malang, 15 Januari 2016

Penulis



| | |
|--|----|
| HALAMAN SAMPUL | 1 |
| LEMBAR PENGESAHAN | 2 |
| LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI | 3 |
| LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS | 4 |
| RIWAYAT HIDUP | 5 |
| UCAPAN TERIMAKASIH | 6 |
| RINGKASAN | 7 |
| SUMMARY | 8 |
| KATA PENGANTAR | 9 |
| DAFTAR ISI | 10 |
| DAFTAR GAMBAR | 11 |
| DAFTAR TABEL | 12 |
| DAFTAR LAMPIRAN | 13 |
| 1. PENDAHULUAN | 14 |
| 1.1 Latar Belakang | 14 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 15 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 16 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 17 |
| 1.5 Waktu dan Tempat Penelitian | 18 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 19 |
| 2.1 Peranan <i>Lactobacillus casei</i> | 19 |
| 2.2 Bakteri Pembentuk Histamin | 20 |
| 2.3 Bakteriosin | 21 |
| 2.3.1 Klasifikasi Bakteriosin | 22 |
| DAFTAR ISI | 23 |
| Halaman | 24 |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | 2.3.2 Karakteristik Bakteriosin |
| Repository Universitas Brawijaya | 17 |
| Repository Universitas Brawijaya | 2.3.3 Mekanisme Penghambat Bakteriosin |
| Repository Universitas Brawijaya | 19 |
| Repository Universitas Brawijaya | 2.4 Potensi Bakteriosin |
| Repository Universitas Brawijaya | 23 |
| 3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN | |
| Repository Universitas Brawijaya | 3.1 Kerangka Pikir |
| Repository Universitas Brawijaya | 25 |
| Repository Universitas Brawijaya | 3.2 Kerangka Operasional |
| Repository Universitas Brawijaya | 29 |
| Repository Universitas Brawijaya | 3.3 Hipotesis |
| Repository Universitas Brawijaya | 30 |
| 4. METODE PENELITIAN | |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.1 Bahan dan Peralatan |
| Repository Universitas Brawijaya | 31 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.1.1 Bahan Penelitian |
| Repository Universitas Brawijaya | 31 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.1.2 Alat Penelitian |
| Repository Universitas Brawijaya | 32 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.2 Metode Penelitian |
| Repository Universitas Brawijaya | 32 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.2.1 Tahap I : Karakterisasi Bakteriosin |
| Repository Universitas Brawijaya | 33 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.2.2 Tahap II:Aplikasi Bakteriosin pada Bakteri Pembentuk Histamin |
| Repository Universitas Brawijaya | 41 |
| Repository Universitas Brawijaya | 4.3 Analisis Data |
| Repository Universitas Brawijaya | 44 |
| 5. HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.1 Fase Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> |
| Repository Universitas Brawijaya | 45 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.2 Karakterisasi Bakteriosin |
| Repository Universitas Brawijaya | 48 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.2.1 Karakterisasi Biologi |
| Repository Universitas Brawijaya | 48 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.2.2. Karakteristik Fisik |
| Repository Universitas Brawijaya | 53 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.2.3 Karakteristik Kimia (Berat Molekul) |
| Repository Universitas Brawijaya | 59 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.3 Aplikasi Bakteriosin pada Bakteriosin Pembentuk Histamin |
| Repository Universitas Brawijaya | 61 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.3.1 Penentuan MIC dan MBC |
| Repository Universitas Brawijaya | 61 |
| Repository Universitas Brawijaya | 5.3.2 Perlakuan Konsentrasi |
| Repository Universitas Brawijaya | 62 |
| 6. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| Repository Universitas Brawijaya | 6.1 Kesimpulan |
| Repository Universitas Brawijaya | 66 |
| Repository Universitas Brawijaya | 6.2 Saran |
| Repository Universitas Brawijaya | 66 |

Gambar**DAFTAR GAMBAR****Halaman**

| | |
|---|----|
| 1. <i>Lactobacillus casei</i> | 7 |
| 2. Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen..... | 21 |
| 3. Kerangka konsep penelitian..... | 28 |
| 4. Kerangka operasional penelitian..... | 29 |
| 5. Prosedur ekstraksi bakteriosin | 37 |
| 6. Grafik untuk menentukan MIC | 43 |
| 7. Kurva pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> | 45 |
| 8. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin <i>Lactobacillus casei</i> | 49 |
| 9. Hasil diameter hambat bakteriosin <i>Lactobacillus casei</i> terhadap bakteri pembentuk histamin..... | 51 |
| 10. Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen | 53 |
| 11. Grafik aktivitas hambat bakteriosin terhadap perlakuan suhu dan lama pemanasan pada bakteri <i>Pseudomonas sp</i> | 55 |
| 12. Grafik aktivitas hambat bakteriosin terhadap perlakuan suhu dan lama pemanasan pada bakteri <i>Micrococcus sp</i> | 55 |
| 13. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap pH | 58 |
| 14. Hasil elektroforesis SDS-PAGE bakteriosin <i>Lactobacillus casei</i> | 60 |
| 15. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin pada konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri pembentuk histamin | 63 |

TABEL

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| 1. Bakteri Penghasil Histamin Pada Ikan Laut | 11 |
| 2. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat | 14 |
| 3. Pengelompokan Bakteriosin..... | 17 |
| 4. Karakter Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i> | 46 |
| 5. Hasil Uji Penentuan MIC dan MBC Ekstrak Bakteriosin | 61 |

LAMPIRAN

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| 1. Perhitungan karakter pertumbuhan bakteri | 79 |
| 2. Data ANOVA dan Uji BNT aktivitas hambat ekstrak bakteriosin | 80 |
| 3. Data ANOVA dan Uji BNT karakterisasi suhu dan lama pemanasan | 81 |
| 4. Data ANOVA dan Uji BNT karakterisasi pH | 83 |
| 5. Perhitungan berat molekul bakteriosin | 85 |
| 6. Grafik penentuan nilai MIC dan MBC | 86 |
| 7. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap <i>Pseudomonas</i> sp | 89 |
| 8. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap <i>Proteus morgani</i> | 90 |
| 9. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap <i>Micrococcus</i> sp | 91 |
| 10. Dokumentasi penelitian..... | 92 |

1.1 Latar Belakang

Produksi perikanan dunia meningkat selama 10 tahun terakhir hingga 11% (Van West, 2006). Berdasarkan data FAO (2010), terjadi peningkatan jumlah produksi produksi perikanan dari 996.659 ton pada tahun 2003 menjadi 1.045.051 ton pada tahun 2004. Ikan merupakan bahan pangan yang sangat mudah mengalami kerusakan (*perishable food*) dan cepat mengalami pembusukan. Kerusakan ini dapat terjadi secara biologis oleh enzim atau mikroorganisme pembusuk (Tabrani, 1997).

Ikan tongkol yang termasuk famili *scombroideae* bila dibiarkan pada suhu kamar, maka akan segera terjadi proses pembusukan. Kandungan air yang tinggi pada tubuh ikan adalah media yang baik untuk pertumbuhan bakteri patogen atau pembusuk serta mikroorganisme yang lain sehingga ikan akan cepat mengalami pembusukan dan menjadi tidak segar lagi. Keracunan dapat terjadi jika ikan tongkol yang telah mengalami proses pembusukan ini dikonsumsi (Kurniawan *et al.*, 2010). Penyebab keracunan adalah karena adanya kontaminasi bakteri patogen seperti *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, dan lain-lain. Keracunan pada ikan tongkol yang sering terjadi disebut keracunan histamin (*scombroid fish poisoning*). Ikan jenis ini mengandung asam amino histidin yang tinggi apabila asam amino ini dikontaminasi oleh bakteri yang menghasilkan enzim histidin dekarboksilase maka akan membentuk histamin (Meryandini *et al.*, 2009).

Beberapa jenis ikan dari famili *Scombroideae* memiliki kandungan histidin bebas yang tinggi, seperti tuna ekor kuning 740mg/100g daging, tuna mata besar mencapai 491mg/100g, mahi-mahi 344mg/100g, kembung 600mg/100g, cakalang 1192mg/100g, dan albakor yang tertinggi sampai 2g/100g. Menurut

1. PENDAHULUAN

pada suhu - 20°C sampai 100°C (Nurhasanah, 2004). Berikut merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu *A. gassericin* dari *Lactobacillus plantarum* KTP 149 (Kato et al., 1994) dan *Lactobacillus LA39 gasseri* (Muriana dan Klaenhammer, 1991) yang sudah terdeteksi, dimurnikan dan dikarakterisasi. Bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat dimana bakteriosin dapat digunakan sebagai bahan pengawet makanan dan mempunyai potensi sebagai pengganti antibiotik (Reenen et al., 2006).

Diketahui bahwa *Lactobacillus casei* adalah bakteri penghasil bakteriosin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa patogen umum dan mikroorganisme pembusuk makanan dengan produksi bakteriosinnya. Hal ini diterangkan oleh Chotiah (2013) dengan hasil penelitian yang diperoleh, yaitu crude bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki sifat antagonistik terhadap bakteri patogen (*S.typhimurium*; *E. coli*; *B. cereus* dan *S. enteritidis*). Aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* K99 enterotoksigenik dan *S. aureus* BCC B2062/ATCC 25923 tidak terlihat. Berdasarkan hal di atas, maka dalam penelitian ini akan membahas mengenai karakteristik kimia dan fisik bakteriosin *Lactobacillus casei* serta aplikasinya pada bakteri pembentuk histamin.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut diatas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin dengan parameter uji aktivitas hambat?

Repository Universitas Brawijaya
2. Bagaimana karakteristik fisik ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* berdasarkan stabilitas suhu dan pH optimum?

Repository Universitas Brawijaya
3. Bagaimana karakteristik kimia ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* berdasarkan berat molekulnya?

Repository Universitas Brawijaya
4. Apakah konsentrasi ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* yang berbeda memberikan pengaruh dalam penghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin?

1.3 Tujuan Penelitian
Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* dalam menghambat bakteri pembentuk histamin.

Adapun tujuan khusus dari penelitian yang didapat dari perumusan masalah yaitu:

1. Mengetahui aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap pertumbuhan bakteri pembentuk histamin.

2. Menentukan stabilitas ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap suhu dan pH.

3. Mendapatkan berat molekul ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei*.
4. Mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin.

1.4 Manfaat Penelitian
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai efektivitas ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* dalam menghambat bakteri pembentuk histamin dengan mengetahui karakteristik ekstrak bakteriosin.

Lactobacillus casei yang meliputi karakteristik kimia (berat molekul) dan karakteristik fisik (stabilitas suhu dan pH optimum) sehingga dapat digunakan untuk bahan pengawet alami dalam penyimpanan dingin daging ikan tongkol.

Serta dapat mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* yang berbeda dalam menghambat bakteri pembentuk histamin.

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Medikal (Biomedik) Fakultas Kedokteran, Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2014 – Desember 2014.

2.1 Peranan *Lactobacillus casei*

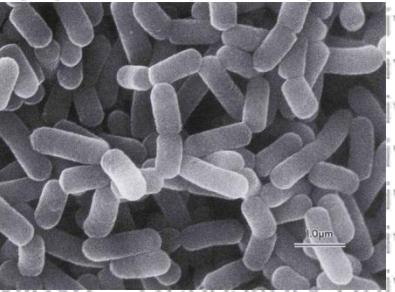
Lactobacillus casei termasuk sebagai Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL diidentifikasi sebagai bakteri pembentuk asam laktat dalam metabolisme karbohidrat dan terdiri dari berbagai macam kelompok bakteri gram positif. BAL mempunyai peranan penting dalam melawan bakteri patogen melalui senyawa peptida antimikroba (Suparjo, 2008). Larsen *et al.*, (1993) menyatakan bahwa *Lactobacillus acidophilus* TK9201 dapat menghambat bakteri *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*, selain itu *Lactobacillus fermentum*, *L.plantarum*, *L. brevis*, dan *L. casei* dari susu dapat menghambat bakteri *Escherichiacoli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, dan *Streptococcus* (Saranya dan Hemashenpagam, 2011).

Lactobacillus casei merupakan bakteri berbentuk batang, Gram positif, bersifat anaerob fakultatif, non-motil, dan tidak dapat membentuk spora. Seperti BAL lainnya, *Lactobacillus casei* toleran terhadap asam dengan asam laktat sebagai produk metabolisme utama. *Lactobacillus casei* bersifat heterofermentatif dan dapat tumbuh pada suhu 15°C. Sebagai bakteri heterofermentatif, *Lactobacillus casei* juga menghasilkan etanol, asam asetat dan CO₂ selain asam laktat dari proses fermentasi glukosa melalui jalur 6-phosphogluconate/phosphoketolase. Produk-produk tambahan tersebut dihasilkan jika tidak ada penerima elektron yang tersedia. Dalam teorinya, fermentasi heterolaktat menghasilkan 1 mol untuk masing asam laktat, etanol, dan CO₂ serta 1 ATP bersih per mol glukosa (Axelsson, 1998). Bakteri *Lactobacillus casei* mampu tumbuh pada suhu 15°C dan memiliki suhu optimum 37°C. Untuk pH optimal produksi asam laktat adalah 3,3-7,0 (Hadiwiyoto, 1994).

2. TINJAUAN PUSTAKA

Lactobacillus casei termasuk dalam kingdom Bacteria, filum firmicutes, class Bacilli, order Lactobacillales, family Lactobacillaceae, genus *Lactobacillus* dan spesies *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus casei* adalah mesofil yang berarti pH optimum sekitar 5,5 sementara suhu optimum sekitar 30 sampai 40°C. Ukuran sel *Lactobacillus casei* adalah sekitar $0,7 - 1,1 \times 2,0 - 4,0 \mu\text{m}$ (Microbiologi Glossary, 2013). Menurut Widodo (2003), *Lactobacillus casei* strain shirota (bakteri Yakult) tumbuh pada suhu $15^\circ - 41^\circ\text{C}$ (optimum 37°C) dan aktivitas bakteri diperlambat pada temperatur di bawah 15°C . Dengan demikian, suhu merupakan faktor ekstrinsik dan merupakan faktor fisik yang sangat penting pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Suhu dapat mempengaruhi lamanya fase lag, kecepatan pertumbuhan, konsentrasi sel, kebutuhan nutrisi, kegiatan enzimatis dan komposisi sel (Nurwantoro dan Djarijah, 1997).

Gambar bakteri *Lactobacillus casei* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Lactobacillus casei*(Microbiologi Glossary, 2013)

Lactobacillus casei adalah bakteri asam laktat homofermentatif yang tahan terhadap enzim pencernaan dan dapat berkembang biak dalam saluran pencernaan. Bakteri asam laktat mengeluarkan peptidoglikan yang membantu pertahanan alamiah dan merangsang respon kekebalan dalam usus tubuh inang. Selain itu, *Lactobacillus casei* memproduksi senyawa bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam usus halus sehingga dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Wahyudi dan Samsundari, 2008).

Keberadaan *Lactobacillus* dalam saluran pencernaan penting untuk menjaga

keseimbangan ekosistem mikroba dalam usus. *Lactobacillus casei* tergolong

bakteri probiotik karena mampu bertahan dalam lambung dan cairan empedu,

mampu mencapai dan berkoloni pada selaput lendir usus kecil, memproduksi

asam laktat yang dapat memacu pertumbuhan bakteri seperti *Bifidobacteria* dan

menghambat pertumbuhan bakteri merugikan (Widodo, 2003).

Lactobacillus casei merupakan spesies yang tergolong probiotik dengan

jumlah paling banyak dalam saluran cerna. Bakteri ini telah menunjukkan peran

melawan bakteri patogen *Escherichia coli* pada percobaan yang menggunakan

tikus yang memiliki penyakit infeksi saluran kemih, melawan *Listeria*

monocytogenes pada tikus, menurunkan virus influenza pada tikus lansia, dan

menurunkan konsentrasi *Helico bacter pylori* pada manusia (Goktepe et al.,

2006). Dari uji secara in vitro diketahui bahwa *Lactobacillus* mampu menghambat

berbagai jenis bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Shigella* dan

Staphylococcus. Kecuali asam laktat yang memiliki sifat antagonis, sejumlah

Lactobacillus mampu menghasilkan komponen antimikroba yang disebut

bakteriosin misalnya asidolin, asidofilin maupun laktosidin yang diperkirakan

memiliki spektrum luas baik terhadap bakteri gram positif maupun negatif

(Ahmed et al., 2010).

Pertumbuhan bakteri asam laktat akan mengalami peningkatan dengan

meningkatnya waktu inkubasi. Peningkatan ini berlangsung secara logaritma.

Meningkatnya jumlah biomassa akan menyebabkan jumlah bakteriosin yang

dihadarkan juga akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner

(Boe, 1996). Fase adaptasi BAL pada awal pertumbuhan sangat diperlukan untuk

menentukan usia kultur kerja setiap bakteri agar bakteri dalam kondisi yang sama, yaitu

kondisi bakteri akan melakukan pertumbuhan secara eksponensial (titik akhir adaptasi).

Hal ini juga dimaksudkan agar pertumbuhan BAL mencapai jumlah maksimal saat kultur

starter dicampurkan dengan susu sebelum proses fermentasi (Suprihanto, 2009). Pada

stater dicampurkan dengan susu sebelum proses fermentasi (Suprihanto, 2009). Pada

saat mikroba dipindahkan ke dalam suatu media, mikroba akan mengalami tahap awal yaitu penyesuaian diri dengan kondisi lingkungan (Middelbeek *et al.*, 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Lama waktu pada fase adaptasi ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, morfologis yang sesuai, kondisi fisiologis dan media kultivasi yang dibutuhkan (Scragg, 1991; Middelbeek *et al.*, 1992; Fardiaz, 1987).

Berdasarkan hasil penelitian Usmiati *et al.*, (2011), kurva pertumbuhan

Lactobacillus casei pada awal fase eksponensial pada jam ke-4. Selama pertumbuhan suatu jenis bakteri melakukan perbanyak sel dengan membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga jumlah tiap generasi menjadi dua kali populasi. Fase logaritmik/eksponensial dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan dari sel-selnya. Menurut

Middelbeek *et al.*, (1992) pada fase logaritmik mikroba akan membelah dengan cepat dan konstan. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi

oleh media tempat tumbuhnya mikroba seperti pH, kelembaban udara kandungan nutrien dan kondisi lingkungan seperti suhu. Fase ini merupakan keadaan dimana pertumbuhan yang seimbang dengan laju pertumbuhan spesifik (μ) konstan, komposisi selular tetap, serta terjadi perubahan komposisi kimiawi media biakan akibat dari penggunaan substrat dan sintesis produk (Sa'id, 1987; Judoamidjojo, 1990; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994).

Pada fase stasioner adalah kondisi dimana jumlah populasi sel tetap atau stasioner karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Sa'id, 1987; Judoamidjojo, 1990; Middelbeek *et al.*, 1992; Mangunwidjaja dan Suryani, 1994) menyatakan pada fase ini sel tetap membelah sehingga ukuran sel menjadi lebih kecil meskipun nutrisi telah habis dan juga mengalami penurunan laju pertumbuhan yang disebabkan karena kekurangan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral (Gaman dan Sherrington, 1994).

Repository Universitas Brawijaya
Berkurangnya beberapa nutrien esensial dalam media atau karena akumulasi

autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya dapat mengakibatkan berhentinya pertumbuhan sel.

2.2 Bakteri Pembentuk Histamin

Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase atau bakteri pembentuk histamin, sebagian besar termasuk ke dalam famili

Enterobacteriaceae. Jenis bakteri pembentuk histamin antara lain: *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio alginolyticus*, *Enterobacter aerogenes*, dan *Proteus* sp. Hampir

semua strain *Morganella morganii* dapat menghasilkan histamin mencapai 400 mg% (Jay, 1996; Indriati et al., 2006). Niven et al., 1981 melaporkan bahwa

Morganella morganii merupakan bakteri pembentuk histamin paling banyak yang ditemukan pada tuna segar, mahi-mahi dan *mackerel*, diikuti oleh *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Edwardsiella* sp., *Proteus* sp., dan *Vibrio* spp. Pada kasus keracunan skombroid telah

ditemukan adanya bakteri *K.pneumoniae* dengan kandungan histamin mencapai 442 mg% pada tuna sashimi (Jay, 1996). *Morganella morganii*, *Klebsiella* sp., dan *Proteus* sp. merupakan bakteri pembentuk histamin utama dan sering

ditemukan pada kasus keracunan histamin setelah mengkonsumsi ikan tuna (Respayeni et al., 2005). *Proteus* sp dan *Hafnia alvei* adalah bakteri pembentuk histamin lemah (Jay, 1996).

Jenis bakteri penghasil histamin pada ikan laut dapat dilihat pada Tabel 1. Hampir semua bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif dan bersifat

anaerobik fakultatif sehingga mampu tumbuh pada kondisi aerobik maupun anaerobik.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Tabel 1. Bakteri Penghasil Histamin pada Ikan Laut

| Bakteri | Spesifikasi |
|--------------------------|---|
| <i>Klebsiella</i> sp. | Gram-negatif, fakultatif anaerobik (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) |
| <i>Clostridium</i> sp. | Gram-positif, fakultatif anaerobik (<i>Clostridium perfringens</i>) |
| <i>Escherichia coli</i> | Gram-negatif, fakultatif anaerobik |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | Gram-positif, fakultatif anaerobik (<i>Lactobacillus 30a</i>) |
| <i>Hafnia</i> sp. | Gram-negatif, fakultatif anaerobik (<i>Hafnia alvei</i>) |
| <i>Proteus</i> spp. | Gram-negatif, fakultatif anaerobik (<i>Proteus morganii</i>) |
| <i>Enterobacter</i> spp. | Gram-negatif, fakultatif anaerobik (<i>Enterobacter aerogenes</i>) |

Sumber : Martin *et al.*, (1982)

Bakteri pembentuk histamin biasa ditemukan secara alami di insang, otot dan isi perut ikan. Sumber bakteri ini kemungkinan besar terletak pada insang

dan isi perut karena jaringan otot ikan segar bebas dari mikroorganisme (Omura

et al., 1978). Bakteri tersebut akan menyebar ke seluruh tubuh ikan selama

penanganan. Lopez-Sabater *et al.*, (1996) melaporkan bahwa bakteri pembentuk

histamin seperti *Proteus morganii* tumbuh baik pada pH netral, tetapi juga dapat

tumbuh pada pH antara 4,7-8,1. Organisme ini tidak tahan terhadap NaCl, tetapi

pada kondisi optimum dapat tumbuh dengan penambahan NaCl lebih dari 5%.

Perbedaan dari jenis bakteri pembentuk histamin pada ikan golongan

scombroideae diakibatkan perbedaan spesies ikan, prosedur penanganan, dan

temperatur.

Bakteri pembentuk histamin dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas.

Pertumbuhan bakteri pembentuk histamin akan berlangsung lebih cepat pada

temperatur yang tinggi (21,1 °C) daripada temperatur rendah (7,2 °C) (FDA,

2001). Laporan-laporan yang berkaitan dengan suhu optimum dan batas suhu

terendah bakteri pembentuk histamin sangatlah bervariasi. Menurut Yoguchi *et*

al., (1990), penyimpanan suhu 25°C selama 24 jam dapat meningkatkan

kandungan histamin sebesar 120 mg/100 g. Menurut Kim *et al.*, (1999), suhu

optimum bakteri pembentuk histamin adalah suhu 25°C. Menurut Fletcher *et*

al. (1996), pembentukan histamin sangatlah kecil bahkan dapat diabaikan pada

suhu 0–5 °C. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Price *et al.*, (1991) juga

menunjukkan bahwa pembentukan histamin pada ikan laut dapat terjadi pada suhu

0–5 °C. Meskipun demikian, pembentukan histamin pada ikan laut dapat terjadi pada suhu 0–5 °C.

menunjukkan bahwa pembentukan histamin akan terhambat pada suhu 0°C atau lebih rendah. Oleh karena itu, *Food and Drug Administration* (FDA) menetapkan batas kritis suhu pertumbuhan histamin pada tubuh ikan yaitu 4,4°C (FDA, 2001). Histamin atau biasa disebut [2-(4-imidazolyl)ethylamine] terbentuk dari proses dekarboksilasi yang dilakukan oleh enzim yang terdapat pada jaringan daging ikan secara alami. Jumlah histamin yang terbentuk karena aktivitas enzim selama proses autolisis sebesar 10-15 mg/100 g daging ikan sangat rendah dibandingkan jumlah histamin yang terbentuk karena aktivitas bakteri selama proses pembusukan berlangsung di bawah kondisi optimum (Heruwati *et al.*, 2008). Menurut Nahla *et al.*, (2005) melaporkan bahwa kandungan histamin pada beberapa ikan spesies lokal di Mesir sebesar 7–26 mg/100 g daging ikan sedangkan kandungan histamin pada ikan impor sebesar 18–50 mg/100 g daging ikan. Keracunan histamin yang terjadi setelah mengkonsumsi produk perikanan atau ikan skombroid yang memiliki kadar histamin yang tinggi seperti tuna, bonito, dan *mackerel*, atau biasa disebut *scombrotoxicity* (keracunan skombroid) (Jay, 1996; Sophia, 2007). Begitu pula pada beberapa ikan-ikan *non scombrotoxic* dapat menyebabkan keracunan histamin seperti mahi-mahi (Niven *et al.*, 1981). Jenis-jenis ikan ini mengandung histidin bebas yang cukup besar pada jaringan daging, dimana histidin bebas akan diubah menjadi histamin oleh enzim L-histidin dekarboksilase yang dihasilkan oleh bakteri pada kondisi tertentu (Sally *et al.*, 1980).

2.3 Bakteriosin

Bakteri asam laktat memproduksi berbagai komponen bermassa molekul rendah yaitu asam, karbon dioksida, alkohol, hidrogen peroksida, diasetil dan metabolit lainnya. Metabolit dari bakteriosin memiliki spektrum aktivitas yang luas dalam melawan spesies lain dan dipengaruhi secara luas oleh matriks makanan

itu sendiri dalam produksinya (Helander *et al.*, 1997). Satu kemampuan bakteri asam laktat yang penting adalah kemampuannya dalam memproduksi komponen antimikroba, yaitu bakteriosin yang mempunyai potensi sebagai biopreservatif yang dapat mengantikan bahan pengawet kimia pada bahan makanan sehingga dapat memperpanjang umur simpan produk. Kemampuan bakteriosin melakukan aktivitasnya sebagai agen biopreservatif diperoleh dari aktivitas penghambatannya terhadap mikroorganisme patogen yang berbahaya (Savadogo *et al.*, 2006).

Bakteriosin adalah peptida-peptida aktif atau kompleks peptida yang disintesis di ribosom, mempunyai aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal.

Bakteriosin merupakan salah satu senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. (Jeevaratnam *et al.*, 2005). Bakteriosin produksi BAL merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ribosom, sensitif terhadap enzim proteolitik dan dapat diinaktivasi oleh enzim protease saluran pencernaan, umumnya tahan panas (60°C atau 100°C selama 30 menit atau lebih), stabil pada pH asam dan netral, diinaktivasi pada pH diatas 8,0 (De Vuyst dan Vandamme, 1994; Holzapfel *et al.*, 1995).

Beberapa spesies bakteri asam laktat yang telah diketahui memiliki kemampuan dalam memproduksi bakteriosin antara lain adalah *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecum*, *Enterococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* dan *Listeria monocytogenes* (Lund *et al.*, 2000). Berikut adalah bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dapat dilihat pada

Tabel 2.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Tabel 2. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat

| Bakteri Asam Laktat | Bakteriosin | Spektrum Penghambatan |
|---|---|--|
| <i>Lactobacillus</i> : <i>L. acidophilus</i> 11088 <i>L. helveticus</i> 481 <i>L. delbrueckii</i> 1106 <i>L. sake</i> 706 | Laktasin F Helvetisin J Laktisin Sakasin A | Laktobasili Laktobasili Laktobasili Bakteri asam laktat, gram + |
| <i>Leuconostoc</i> : <i>L. gelidium</i> UAL181 <i>L. gelidium</i> IN139 | Belum dinamai | Bakteri asam laktat, gram + Bakteri asam laktat, gram + |
| <i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> 11454 <i>L. lactis</i> DRC1 <i>L. cremoris</i> 346 <i>L. cremoris</i> LMG230 | Nisin Drisin Diplokokin Laktokokin | Bakteri asam laktat, gram + Laktokoki Laktokoki laktokoki |
| <i>Pediococcus</i> : <i>P. acidilactici</i> H <i>P. pentosaceus</i> FBB61 | Pediosin AcH Pediosin A | Bakteri asam laktat, gram + Bakteri asam laktat, gram + |

Sumber : Muriana, (2002)

Bakteriosin diproduksi di dalam media kultur selama fase pertumbuhan eksponensial sampai fase pertumbuhan stasioner (De Vuyst dan Vandamme, 1994). Menurut Drider et al., (2006) bakteri asam laktat mengalami modifikasi enzimatis pada awal fase stasioner, dan akan mengubah prebakteriosin menjadi bakteriosin yang aktif pada proses pasca translasi. Aktivitas bakteriosin dapat mengalami penurunan apabila waktu inkubasi yang digunakan terlalu lama, hal ini dikarenakan pengaruh inaktivator bakteriosin yang spesifik atau sifat reabsorpsi bakteriosin oleh sel produsen dan terbebasnya protease dari sel autolisis, bakteriosin juga merupakan molekul proteaneus dimana molekulnya mudah terdegradasi (Joe et al., 1996).

Efek pengawetan dan daya hambat dari BAL berkaitan dengan substansi antimikrobanya (Abee et al., 1995; Conventry et al., 1995). Bakteri asam laktat akan menghasilkan metabolit-metabolit selama proses fermentasi yang menyebabkan perubahan bentuk makanan dan rasa serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk (Ray, 1992). Metabolit tersebut antara lain : asam organik (asam laktat dan asetat), diasetil, hidrogen peroksida

Repository Universitas Brawijaya
dan bakteriosin, yang semuanya memiliki aktifitas antimikroba (De Vuyst dan Vandamme, 1994).

Berikut beberapa kriteria penentuan bakteriosin, antara lain bakteriosin tersusun atas protein, aktif terhadap bakteri yang dekat secara filogenik, bersifat bakterisidal dan bakteriostatik, serta tidak membunuh bakteri penghasilnya (Tagg et al., 1976 dan Jack et al., 1995). Menurut Bhunia et al., (1987), bakteriosin mempunyai sifat yang unik, yaitu tetap aktif pada perlakuan suhu rendah maupun suhu tinggi dan tetap aktif pada kondisi asam maupun basa kuat. Bakteriosin mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik yang menunjukkan bahwa bakteriosin tersusun atas komponen protein yang dapat menghambat bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif, disamping itu juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang kekerabatannya dekat secara filogenik dengan induk bakteri penghasil bakteriosin (Jack et al., 1995).

2.3.1 Klasifikasi Bakteriosin

Bakteriosin dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe berdasarkan spektrum aktivitasnya. Tipe pertama adalah bakteriosin yang mempunyai spektrum aktivitas yang sempit, mempunyai efek sidal terhadap organisme yang mempunyai kekerabatan yang dekat. Plantaricin A, laktosin 27, dan diplokokin termasuk dalam bakteriosin tipe pertama. Tipe kedua adalah bakteriosin yang memiliki spektrum yang luas dengan menghambat organisme gram positif. Reuterin, pediosin A, dan nisin termasuk dalam bakteriosin tipe kedua. Seperti *Listeria monocytogenes* dan *Clostridium botulinum* yang merupakan banyak spesies dari bakteri pembusuk dan patogen pada makanan termasuk dalam sasaran kelompok yang terakhir (Hurst, 1983; Lindgren dan Dobrogosz, 1990; Marugg, 1991).

Menurut Jimenez-Diaz (1993), terdapat empat macam bakteriosin yang dihasilkan jenis BAL yang berbeda dan diketahui memiliki aktivitas hambat terhadap bakteri patogen dan pembusuk makanan serta meningkatkan daya simpan makanan, antara lain :

- a. *Lantibiotik*, merupakan bakteriosin yang mengandung cincin lantionin dalam molekulnya, seperti Nisin, Lacticin 481, Lacticin S, serta Streptococcin SA-FF22.
- b. Bakteriosin berukuran kecil (< 10 kDa), bakteriosin ini relatif tahan terhadap panas, peptida pada sisi aktifnya tidak mengandung lantionin. Jenis ini dibagi lagi ke dalam 3 sub kelas yaitu peptida *Listeria* aktif dengan sekumpulan sekuen N terminal, bakteriosin yang membentuk kelompok berpori dengan aktivitas duapeptida yang berbeda, serta bakteriosin yang memerlukan peptida teraktifasi-tioluntuk mengurangi residu sistein dalam aktivitasnya.
- c. Bakteriosin bermolekul protein besar (> 30 kDa), dimana mengandung protein yang tidak tahan terhadap panas seperti Helveticin J dan Brevicin 27.
- d. Bakteriosin yang mengandung protein kompleks, dimana terdiri atas komponen karbohidrat maupun lipid, seperti *Plantaricin S* yang mengandung glikoprotein.

Berdasarkan Klaenhammer (1990), bakteriosin yang berasal dari bakteri asam laktat dibagi menjadi empat kelas, yaitu (1) Kelas I, yaitu bakteriosin yang dikenal sebagai lantibiotik; (2) Kelas II, bakteriosin yang berukuran kecil (< 10 kDa), bakteriosin ini mempunyai membran aktif yang stabil pada kondisi panas; (3) Kelas III, bakteriosin yang berukuran lebih besar (> 30 kDa), bakteriosin ini tidak stabil pada kondisi panas; (4) Kelas IV, Bakteriosin kompleks yang bergabung dengan karbohidrat atau lipid. Berikut ini adalah pengelompokan bakteriosin yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Tabel 3. Pengelompokan Bakteriosin

| Kategori | Karakteristik | Subkategori | Contoh | Sumber |
|-----------|--|--|---|--|
| Kelas I | Lantibiotik (mengandung lantionin dan β-lantionin) | Tipe A (molekul panjang, < 4 kDa) Tipe B (molekul bulat, 1,8-2,1 kDa) | Nisin A (<i>Lactococcus lactis</i>) ^a Subtilin (<i>Bacillus subtilis</i>) ^b Epidermin (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) ^c Mersacidin (Bacillus sp. Galur HIL Y-85, 54728) ^d Mutacin B-Ny266 (<i>Streptococcus mutans</i>) ^e | ^a Cuesta et al., (2000) ^b Teo & Tan (2005) ^c Hoffmann et al., (2004) ^d Altena et al., (2000) ^e Meira et al., (2005) |
| Kelas II | Bakteriosin tidak termodifikasi, stabil panas, mengandung peptida dengan BM < 10 kDa | Sub kelas IIa (bakteriosin antisteril seperti pediocin) Subkelas IIb (bakteriosin dua peptida) Subkelas IIc (bakteriosin peptida lain) | Bavaricin A (<i>Lactobacillus sakei</i>) Coagulin (<i>Bacillus coagulans</i>) Enterocin SE-K4 (<i>E. faecium</i>) Lactoccocin MMFII (<i>L. lactis</i>) Leucin A (<i>Leuconostoc gelidum</i>) Plantaricin EF (<i>L. plantarum</i>) Plantaricin JK (<i>L. plantarum</i>) Lactoccocin 972 (<i>Lactococcus lactis</i>) | |
| Kelas III | Bakteriosin dengan BM > 30 kDa | | Helveticin J (<i>L. helveticus</i>) Millericin B (<i>Streptococcus milleri</i>) ^g | ^f Mathot et al., (2003) ^g Heng et al., (2006) |

Sumber : Driber et al., (2006)

2.3.2 Karakteristik Bakteriosin

Karakterisasi merupakan tahap yang dilakukan untuk menentukan sifat

dari bakteriosin yang dilihat pengaruh aktivitasnya terhadap perlakuan lingkungan seperti perlakuan enzimatis, suhu, tingkat keasaman, serta kemampuan mempertahankan aktivitasnya selama penyimpanan. Di dalam karakterisasi produk bakteriosin, sensitivitas bakteriosin terhadap enzim protease merupakan kunci utama penentu karakter bakteriosin. Enzim protease berperan sebagai agen penghambat (*inhibitor*) aktivitas bakteriosin. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteriosin tersusun atas komponen protein tinggi yang pada umumnya akan dihambat beberapa kali oleh enzim proteolitik (De Vuyst et al., 1994). Bakteriosin di karakterisasi dengan melihat aktivitasnya terhadap kestabilan suhu dan pH, kemudahan terdenaturasi oleh enzim proteolitik, dan kestabilan selama penyimpanan (Ogunbanwo et al., 2003).

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository
Repository
Repository

Ketahanan terhadap panas, karakteristik umum dari banyak bakteriosin dan substansi seperti bakteriosin yang diproduksi BAL bervariasi dari 60°C atau 100°C selama lebih dari 30 menit (misalnya lactocin 27, lactocin S) hingga autoklaf 121°C selama 15-20 menit (misalnya nisin, lactacin B). Ketahanan terhadap panas kemungkinan terjadi karena formasi dari struktur globular kecil dan adanya region hidrofobik yang kuat, ikatan silang yang stabil, atau kandungan glisin yang tinggi (deVuyst dan Vandamme, 1993). Beberapa bakteriosin yang tahan terhadap pemanasan telah dilaporkan seperti Gonzalez *et al.* (1994) melaporkan bahwa *plantaricin* C yang diproduksi *Lactobacillus plantarum* yang diisolasi dari susu menunjukkan aktivitas yang sangat stabil pada pemanasan pada suhu 100°C selama 60 menit dan 121°C selama 10 menit. Khalid *et al.*,(1999) yang mendeksi dan mengkarakterisasi bakteriosin asal isolat *Lactobacilli* (*lactocin*) melaporkan bahwa *lactocin* dapat stabil terhadap pemanasan pada suhu 100°C selama 4 jam dan masih dapat mempertahankan aktivitasnya setelah pemanasan pada suhu 121°C selama 15 menit. Karakteristik dari bakteriosin antara lain : 1) memiliki spektrum aktivitas yang relatif sempit, terpusat di sekitar spesies penghasil bakteriosin (hubungan filogenik yang cukup dekat), 2) memiliki senyawa aktif yang tersusun atas protein yang disintesis di ribosom, 3) pada sel sasarnya terdapat reseptor, d) di plasmid terdapat gen penyandi penentu, yang mempunyai peran dalam produksi dan imunitas (Tagg *et al.*, 1976). Karakter bakteriosin lainnya adalah bersifat tahan terhadap panas dan bersifat bakterisidal (Jack *et al.*, 1995).

Umumnya bakteriosin bersifat tahan panas pada pH rendah, sedangkan pada pH alkalis bakteriosin menjadi inaktif. Hal ini menunjukkan bahwa molekul bakteriosin meregang pada pH alkalis dan proses ini dipercepat dengan suhu yang ditingkatkan, sehingga bakteriosin terhidrolisis, daya larutnya berkurang, dan aktivitas biologisnya hilang. Perlakuan dengan enzim proteolitik

menyebabkan aktivitas antibakterialnya menurun berturut-turut mulai dari ekstrak pankreas, papain, bromelin dan protease sedangkan dengan enzim amyloglukosidase aktivitasnya tetap (Tagg *et al.*, 1976). Penyimpanan pada suhu refrigerator tidak merusak bakteriosin, bahkan pada suhu -20°C bakteriosin masih menunjukkan aktivitas hambat terhadap bakteri patogen dan pembusuk makanan (Gonzales *et al.*, 1996).

2.3.3 Mekanisme Penghambat Bakteriosin

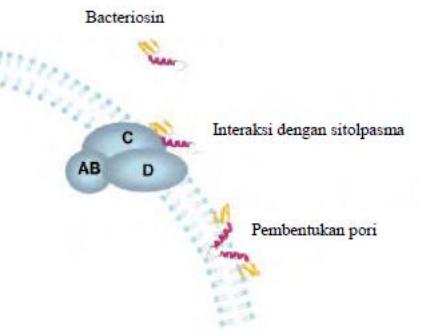
Pada dasarnya penggunaan BAL dalam makanan adalah untuk memperpanjang waktu penyimpanan, meningkatkan kualitas dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan pembusuk (Holzapfel *et al.*, 1995). Bakteriosin mempunyai mekanisme kerja tertentu untuk menghambat bakteri lain. Untuk melakukan aktivitasnya, bakteriosin ini terlebih dahulu harus masuk dahulu ke dalam sel sasarnya, melewati dinding atau membran sitoplasma untuk masuk atau teradsorpsi ke dalam sel sasaran (Hurst, 1983) dan hal ini tergantung pada permeabilitas dinding atau membran sel bakteri sasaran bakteriosin beberapa mekanisme kerja bakteriosin dalam menghambat bakteri sasarnya dapat berupa penghambatan sintesis protein, penghambat komponen dinding atau membran sel, kerusakan komponen intra selular seperti ribosom atau ATP atau keluarnya ion K⁺ (Marugg, 1991). Beberapa bakteriosin menyebabkan bakteriolisis (melisis sel bakteri) karena kemampuannya menderegulasi sistem autolitik dari sel yang sensitif sehingga menyebabkan kerusakan pada lapisan peptidoglikan. Bakteriosin bekerja pada konsentrasi yang sangat kecil, yaitu dalam nanomolar (Nes & Holo, 2000).

Mekanisme bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan mikroba adalah : (1) perusakan dinding sel sehingga dinding sel mikroba mengalami lisis; (2) perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan

kebocoran nutrien di dalam dinding sel; (3) denaturasi protein sel; (4) merusak sistem metabolisme dalam sel dengan menghambat kerja enzim intraseluler (Branen dan Davidson, 1993). Menurut Pelczar dan Chan, (1986), secara umum mekanisme aktivitas senyawa antimikrob dapat dilakukan oleh senyawa bioaktif melalui mekanisme yang berbeda, yaitu: (i) mengganggu atau merusak dinding sel, (ii) terjadinya perubahan atau peningkatan permeabilitas sehingga menyebabkan hilangnya komponen penyusun seluler akibat dari beraksi dengan membran sel, (iii) enzim-enzim esensial menjadi inaktivasi, dan (iv) fungsi dari material genetik menjadi inaktivasi.

Hipotesis mekanisme bakteriosin yang diterima secara luas adalah bakteriosin bekerja dalam dua tahap yaitu proses adsorpsi bakteriosin pada reseptor spesifik atau non spesifik pada permukaan sel yang mengakibatkan kematian sel. Membran sitoplasma merupakan target utama dari bakteriosin yang berasal dari bakteri asam laktat, karena bakteriosin memulai reaksi-reaksi dengan mengubah permeabilitas membran sehingga menghilangkan tenaga gerak proton atau mengganggu transport membran yang mengakibatkan produksi energi dan biosintesis protein atau asam nukleat menjadi terhambat (Nissen-Meyer, 1992). Semua sel hidup memiliki membran sitoplasma yang bersifat selektif permeable, melakukan pengangkutan aktif, sehingga mempunyai peran dalam pengendalian komponen dalam sel. Bila integritas fungsi sel sitoplasma terganggu akan menyebabkan substansi yang terdapat di dalam sel akan lolos dari sel sehingga mengakibatkan timbulnya kerusakan atau kematian sel (Drider et al., 2006). Mekanisme aksi penghambatan bakteriosin terhadap bakteri target dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2. Mekanisme Aksi Bakteriosin Merusak Membran Sel Bakteri Patogen(Drider et al., 2006)



Beberapa cara antimikroba dalam aksinya melawan mikroorganisme, yaitu efek bakterisidal, bakteriostatik ataupun bakteriolisis. Secara umum bakteriosin asal BAL memiliki kemampuan melawan bakteri lain dengan efek bakterisidal (Gonzalez et al., 1996). Aksi bakteriosin menghambat bakteri sensitif terutama efek bakterisidal diawali dengan destabilisasi fungsi membran sitoplasma. Destabilisasi fungsi membran berupa peningkatan permeabilitas membran, yang berakibat terganggu keseimbangan barier dan dapat menyebabkan kematian sel (Jack et al., 1995). Molekul bakteriosin akan menempel di permukaan membran sel bakteri dan membentuk pori-pori. Jika pori-pori terbentuk di membran sitoplasma sel, maka akan menyebabkan membran sitoplasma menjadi tidak selektif sehingga banyak molekul-molekul kecil dan ion-ion yang melewati membran. Hal ini akan berakibat proses metabolisme sel akan terganggu, seperti sintesis ATP akan terhambat dan sistem transport sel akan terganggu sehingga menyebabkan kematian sel dan akhirnya sel mengalami lisis.

Kebocoran yang terjadi akibat pembentukan lubang pada membran sitoplasma ditunjukkan oleh adanya aktivitas keluar masuknya molekul-molekul seluler. Kebocoran yang terjadi berdampak pada penurunan gradient pH seluler. Secara umum, pembentukan lubang sitoplasma oleh bakteriosin menyebabkan

terjadinya perubahan gradient potensial membran (ΔP) dan lepasnya molekul intraseluler serta masuknya substansi ekstraseluler (lingkungan). Dalam proses ini akan berefek pada terhambatnya pertumbuhan sel yang mengakibatkan terjadinya kematian sel yang sensitif terhadap bakteriosin (Drider *et al.*, 2006). Misalnya pada *Bacillus stearothermophilus* dan *Escherichia coli* sintesis peptidoglikannya terhambat. Tentunya karena peptidoglikan merupakan bagian penting dari dinding sel bakteri gram positif, maka hal ini dapat berakibat cukup fatal bagi bakteri yang dikendalikan bakteriosin tersebut. Laktokokin B yang dapat dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4, dapat menyebabkan lubang pada membran sitoplasma dan kerusakan komponen-komponen intraselular (Venema *et al.*, 1994).

Efek bakterisidal dari bakteriosin dihasilkan dari perusakan kestabilan fungsional membran sitoplasma. Beberapa bakteriosin dapat menyebabkan lisis pada sel sensitif. Secara kimia, protein bakteriosin disintesis secara ribosomal, kationik, amphipathik, memiliki struktur α -helik dan β -sheet, atau keduanya dan dapat memiliki thioether, jembatan disulfid atau bebas dari kelompok thiol. Keberadaan struktur amphipathika-helik menjadikan bakteriosin dapat berinteraksi dengan fase cair dan lemak ketika berikatan pada permukaan membran sensitif sel bakteri dan mengawali fungsi-fungsinya untuk merusak kestabilan dan membunuh sel (Ray dan Bhunia, 2008).

Bakteri gram positif umumnya lebih sensitif terhadap bakteriosin, dan bakteri Gram negatif resisten terhadap bakteriosin. Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif memiliki molekul lipopolisakarida (LPS) yang terdapat pada permukaan membran sitoplasma, yang berperan sebagai pembatas dalam pencegahan terjadinya kontak antara molekul bakteriosin dengan fosfolipid anionik di membran sitoplasma bagian dalam. Molekul lipopolisakarida inilah yang menyebabkan bakteri Gram negatif tahan terhadap garam empedu.

Dengan memberikan perlakuan fisik maupun kimia contohnya dengan memberikan perlakuan tekanan tinggi terhadap sel, bakteri gram negatif dapat menjadi sensitif terhadap bakteriosin (Ray dan Bhunia, 2007).

Spektrum antimikrob didefinisikan sebagai satuan galur yang sensitif terhadap bakteriosin yang diberikan. Sensitivitas ini tergantung dua tahap pada model fungsi *in vivo*. Tahap pertama, bakteriosin berinteraksi dengan struktur permukaan sel, seperti membran dan atau molekul reseptor. Tahap kedua, bakteriosin membuat permeabilisasi membran melalui pembentukan lubang. Pengikatan awal dipengaruhi oleh komposisi membran, muatan membran, dan adanya struktur molekul target (reseptor). Tahap kedua dipengaruhi oleh komposisi membran, struktur C terminal pada bagian membran yang terpermeabilisasi, dan adanya protein imunitas (Drider *et al.*, 2006).

2.4 Potensi Bakteriosin

Bakteriosin adalah peptida-peptida atau protein yang memiliki efek bakterisidal atau bakteristatik. Bakteriosin dari bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai bahan pengawet alami dalam industri pangan (Larsen *et al.*, 1993). Bakteri asam laktat sering ditemukan sebagai mikroflora dominan yang menghambat bakteri pembusuk dan patogen dalam fermentasi spontan. Bakteri asam laktat termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam makanan karena tidak menghasilkan toksin dan bersifat tidak toksik, atau dikenal sebagai *food grade microorganism* (Holzapfel *et al.*, 1995) atau disebut juga mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan (Garver dan Muriana, 1993).

Penggunaan bakteriosin beberapa keuntungan, yaitu (a) bakteriosin tidak termasuk dalam bahan toksik dan mudah mengalami biodegradasi oleh enzim proteolitik karena bakteriosin

merupakan senyawa protein, (2) dapat digunakan sebagai bahan pengawet makanan sebagai upaya dalam pengurangan penggunaan bahan kimia karena bakteriosin aman terhadap lingkungan, (3) mudah dicerna oleh enzim-enzim saluran pencernaan sehingga tidak berbahaya dalam mikroflora usus, dan (4) dapat dijadikan sebagai kultur bakteri unggul yang dapat menghasilkan senyawa senyawa antimikrobal yang telah dimurnikan atau sebagai senyawa antimikroba terhadap bakteri patogen (Nurliana, 1997).

Penggunaan bakteriosin sebagai bahan pengawet makanan dapat mempertahankan sifat organoleptik dan kandungan nutrisi tidak hilang. Hal ini dapat menjamin keamanan makanan, kesegaran rasa, kesiapan untuk disajikan, dan penampakan dari produk. Fungsi Bakteriosin jika ditambahkan pada makanan antara lain : sebagai bahan pengawet, zat additif atau bumbu perasa, starte rbakteriogenik, bahan tambahan untuk melindungi kultur mikroba, bakteriosin yang diimmobilisasi dapat digunakan sebagai *bioactive food packaging*.

(Galvez *et al.*, 2007). Bakteriosin produksi BAL sangat menjanjikan untuk digunakan sebagai bahan pengawet pangan secara biologis (De Vuyst dan Vandamme, 1994) dan banyak peneliti mempelajari kemungkinan pemakaian bakteriosin produksi BAL sebagai biopreservatif makanan (Abee *et al.*, 1995).

Bakteriosin yang menjadi bakterisidal untuk patogenik Gram positif dan bakteria perusak yang sangat penting pada makanan. Akan tetapi hanya sedikit yang telah diuji pada sistem makanan. Beberapa studi menyatakan bahwa satu strain bakteriosin yang telah diinokulasi dengan patogenik atau bakteria perusak akan menghasilkan bakteriosin yang dapat mengontrol pertumbuhan dari bakteria perusak dan yang patogen itu sendiri. Bakteriosin ini sangat efektif dipakai untuk mengontrol bakteri patogen dan perusak pada produk makanan yang dingin dan makanan dalam kantong vakum yang diharapkan agar mempunyai daya simpan yang lama (Balia, 2009).

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Pikir

Ikan merupakan bahan pangan yang sangat mudah mengalami

kerusakan (*perishable food*) dan cepat mengalami pembusukan. Kerusakan ini dapat terjadi secara biologis oleh enzim atau mikroorganisme pembusuk. Faktor-faktor penyebab kebusukan disebabkan adanya sistem enzim dari ikan itu sendiri, sistem enzim dari mikroorganisme dan penegikan. Proses pembusukan ikan dapat terjadi karena adanya perubahan aktivitas enzim-enzim tertentu yang terdapat di dalam tubuh, perubahan aktivitas bakteri dan mikroorganisme lain serta karena oksidasi lemak oleh udara. Proses kemunduran mutu ikan makin cepat jika cara penanganan atau penangkapan yang kurang baik, sanitasi yang tidak memadai serta terbatasnya saran distribusi dan pemasaran sehingga diperlukan penanganan yang khusus untuk mempertahankan mutu kesegaran ikan. Penanganan ikan segar adalah salah satu hal penting dari mata rantai industri perikanan karena dapat mempengaruhi mutu ikan segar. Mutu ikan segar dipengaruhi oleh cara penanganan ikan segar baik atau buruk (Afrianto dan Liviawaty, 2010).

Ikan tongkol yang termasuk famili *scombroideae* bila dibiarkan pada suhu kamar, maka akan segera terjadi proses pembusukan. Kandungan air yang tinggi pada tubuh ikan adalah media yang baik untuk pertumbuhan bakteri patogen atau pembusuk serta mikroorganisme yang lain sehingga ikan akan cepat mengalami pembusukan dan menjadi tidak segar lagi. Keracunan dapat terjadi jika ikan tongkol yang telah mengalami proses pembusukan ini dikonsumsi (Kurniawan et al., 2010). Keracunan yang sering terjadi pada ikan tongkol, yaitu keracunan histamin (*scromboid fish poisoning*). Keracunan *histamine fish poisoning* atau keracunan histamin adalah keracunan yang disebabkan oleh

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

pangan yang sangat mudah mengalami

kerusakan (*perishable food*) dan cepat mengalami pembusukan. Kerusakan ini dapat terjadi secara biologis oleh enzim atau mikroorganisme pembusuk. Faktor-faktor penyebab kebusukan disebabkan adanya sistem enzim dari ikan itu sendiri, sistem enzim dari mikroorganisme dan penegikan. Proses pembusukan ikan dapat terjadi karena adanya perubahan aktivitas enzim-enzim tertentu yang terdapat di dalam tubuh, perubahan aktivitas bakteri dan mikroorganisme lain serta karena oksidasi lemak oleh udara. Proses kemunduran mutu ikan makin cepat jika cara penanganan atau penangkapan yang kurang baik, sanitasi yang tidak memadai serta terbatasnya saran distribusi dan pemasaran sehingga diperlukan penanganan yang khusus untuk mempertahankan mutu kesegaran ikan. Penanganan ikan segar adalah salah satu hal penting dari mata rantai industri perikanan karena dapat mempengaruhi mutu ikan segar. Mutu ikan segar dipengaruhi oleh cara penanganan ikan segar baik atau buruk (Afrianto dan Liviawaty, 2010).

Ikan tongkol yang termasuk famili *scombroideae* bila dibiarkan pada suhu kamar, maka akan segera terjadi proses pembusukan. Kandungan air yang tinggi pada tubuh ikan adalah media yang baik untuk pertumbuhan bakteri patogen atau pembusuk serta mikroorganisme yang lain sehingga ikan akan cepat mengalami pembusukan dan menjadi tidak segar lagi. Keracunan dapat terjadi jika ikan tongkol yang telah mengalami proses pembusukan ini dikonsumsi (Kurniawan et al., 2010). Keracunan yang sering terjadi pada ikan tongkol, yaitu keracunan histamin (*scromboid fish poisoning*). Keracunan *histamine fish poisoning* atau keracunan histamin adalah keracunan yang disebabkan oleh

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository
Repository
Repository
Repository

Repository Universitas Brawijaya
histamin setelah mengkonsumsi ikan laut yang mengandung histidin bebas (*free histidine*) yang tinggi, dimana histidin bebas adalah prekursor histamin. Histamin merupakan senyawa amin yang dihasilkan dari proses dekarboksilasi histidin bebas (α -amina- β -inidosal asam propionat) (Mangunwardoyo *et al.*, 2007).

Keberadaan histamin pada bahan pangan ini menandakan tingkat kemunduran mutu bahan tersebut. Pembentukan amina biogenik ini tergantung dari ketersediaan asam amino bebas, keberadaan dekarboksilase yang dikandung oleh mikroorganisme (bakteri dengan enzim yang dapat menyebabkan dekarboksilasi asam amino bebas) dan kondisi yang mendukung pertumbuhan mikroba dan aktifitas enzimatis (Putro, 2002). Histamin dihasilkan pada daging ikan melalui reaksi dekarboksilase histidin bebas oleh bakteri yang mengandung enzim histidin dekarboksilase (Purves *et al.*, 2001).

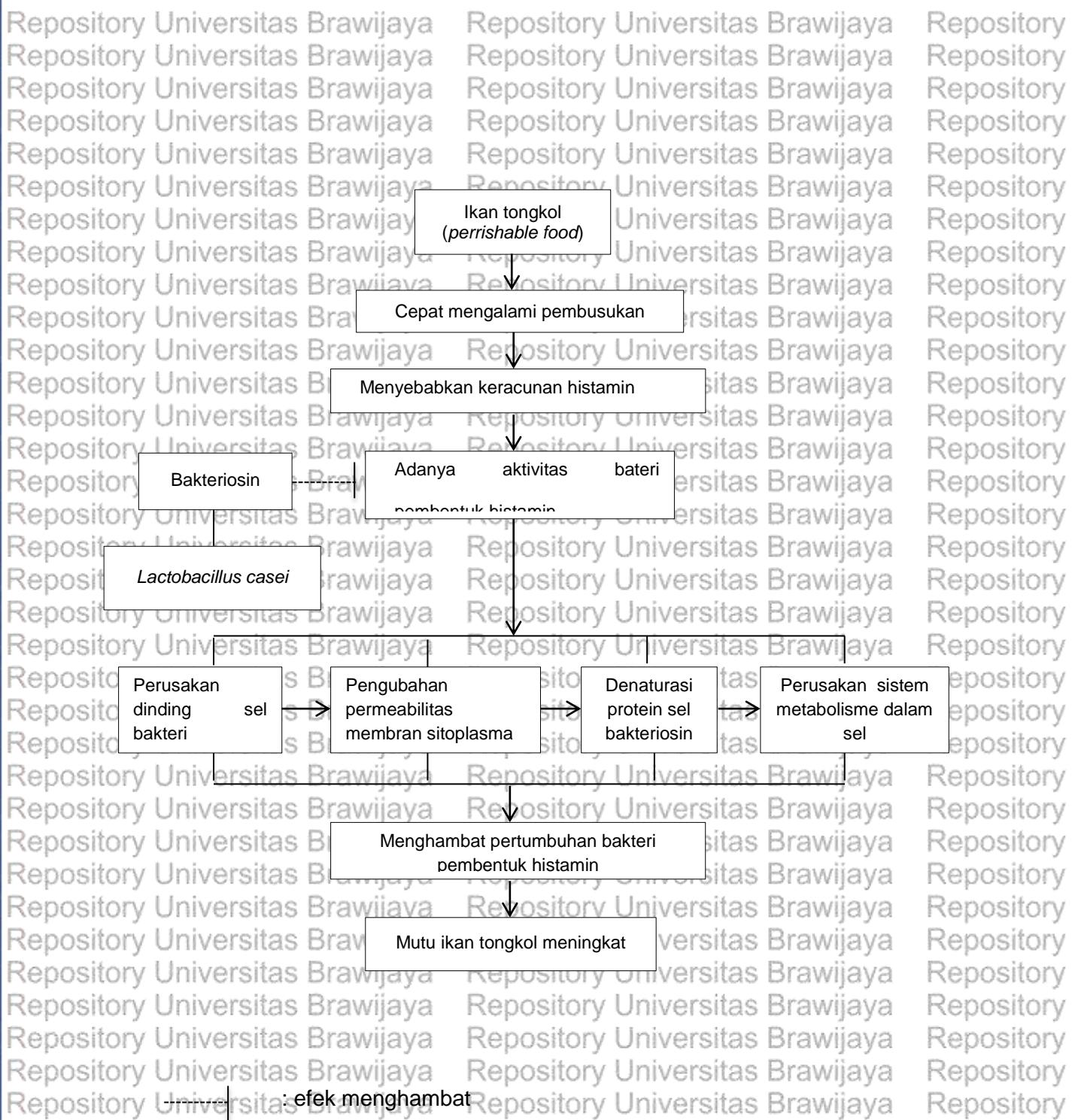
Untuk mengurangi terjadinya keracunan histamin, perlu dilakukan penghambatan pertumbuhan bakteri pembentuk histamin yang dapat menyebabkan terjadinya dekarboksilasi asam amino bebas dengan menggunakan metabolit BAL. Efek pengawetan dan daya hambat dari BAL berkaitan dengan substansi antimikroanya (Abree *et al.*, 1995; Conventry *et al.*, 1995). Bakteri asam laktat akan memproduksi metabolit-metabolit yang menyebabkan terjadinya perubahan rasa dan bentuk makanan serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk selama proses fermentasi (Ray, 1992). Metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat antara lain : , hidrogen peroksida, diasetil, asam organik (asam laktat dan asetat) dan bakteriosin, yang semuanya memiliki aktifitas antimikroba (De Vuyst dan Vandamme, 1994).

Bakteriosin didefinisikan sebagai peptida-peptida aktif atau kompleks peptida yang disintesis di ribosom, dan mempunyai aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriosin adalah suatu senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh

Repository Universitas Brawijaya
bakteri asam laktat (*Jeevaratnam et al.*, 2005). Dengan adanya sifat bakteriosin yang memiliki aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal, bakteriosin dapat digunakan sebagai bahan biopreservatif pada bahan pangan guna memperpanjang umur simpan produk karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk. Bakteriosin memiliki kemampuan dalam melakukan aktivitasnya sebagai biopreservatif yang ditunjukkan oleh efek penghambatannya terhadap mikroorganisme patogen yang berbahaya (*Savadogo et al.*, 2006).

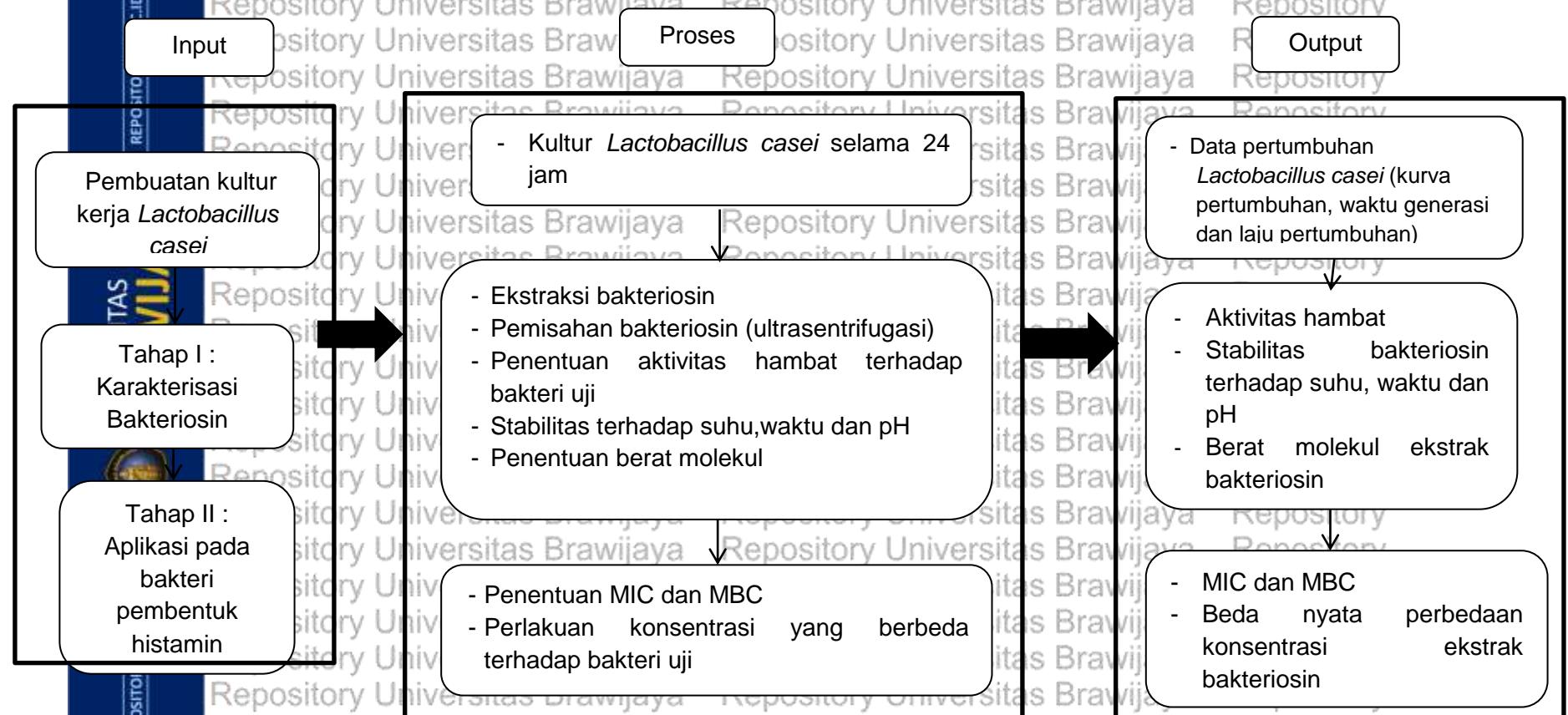
Branen dan Davidson, (1993) menyatakan mekanisme bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan mikroba oleh bakteriosin adalah : (1) perusakan dinding sel sehingga sel mikroba mengalami lisis atau menghambat pertumbuhan dinding sel pada sel yang sedang tumbuh; (2) perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga terjadi menyebabkan kebocoran nutrien di dalam dinding sel; (3) protein sel mengalami denaturasi; (4) menghambat kerja enzim intraseluler yang berakibat rusaknya sistem metabolisme dalam sel.

Telah diketahui bahwa bakteriosin adalah suatu senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas bakterisidal dan bakteriostatik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk pada bahan pangan, hal ini terlihat pada penelitian *Chotiah (2013)* yang menyatakan bahwa *Lactobacillus casei* memiliki spektrum luas dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri kontaminan penyebab pembusukan makanan dan *foodborne disease* dimana diameter zona hambat sebesar 17mm terhadap *B. cereus* sehingga perlu dilakukannya penelitian mengenai karakteristik bakteriosin *Lactobacillus casei* serta aplikasinya pada bakteri pembentuk histamin dengan tujuan untuk mengetahui apakah bakteriosin *Lactobacillus casei* mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.:



Gambar 3. Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4. Kerangka Operasional Peneltian

3.3 Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini, antara lain:

- Umum:

Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin

- Khusus

1. Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki aktivitas hambat terhadap pertumbuhan bakteri pembentuk histamin

2. Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* stabil terhadap suhu dan pH.

3. Berat molekul ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei*, yaitu 5 – 15 kDa.

4. Pemberian konsentrasi ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* yang berbeda memberikan pengaruh terhadap penghambatan bakteri pembentuk histamin.

4.1 Bahan dan Peralatan

4.1.1 Bahan Penelitian

Isolat bakteri asam laktat yang digunakan adalah bakteri *Lactobacillus casei* ATCC 7649 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri pembentuk histamin sebagai bakteri uji yang digunakan, yaitu *Pseudomonas* sp. (bakteri Gram Negatif), *Proteus morgani* (bakteri Gram Negatif), *Micrococcus* sp (bakteri Gram Positif) dan *Staphylococcus* sp (bakteri Gram Positif) diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Bahan yang digunakan pada ekstraksi bakteriosin antara lain media MRS Broth merk MERCK, yeast merk MERCK, media Nutrient Agar (NA) merk MERCK, glukosa, peptone, NaOH 1 M merk MERCK, ammonium sulfat 60% merk MERCK, potassium phosphat buffer pH 7, Na₂CO₃ 5% merk MERCK, EDTA 50 mM pH 8, akuades steril, kantong selofan, kapas, kertas, karet, spiritus dan tissue. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji karakteristik bakteriosin dan aplikasi bakteriosin pada bakteri pembentuk histamin antara lain media Nutrient Broth (NB) merk MERCK, media MHA merk MERCK, Na fisiologis, *Buffered Pepton Water*, NaOH 1M merk MERCK, HCl 1M merk MERCK, Tris-Cl 1,5 M pH 8,8, Acrylamide 30%, Ammonium Persulfate (APS), Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), tetrametiletilendiamin (TEMED), Reducing Sample Buffer (RSB), commasie blue, metanol, asam asetat glasial, kertas cakram, alkohol 70% dan akuades.

METODE PENELITIAN

4.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi bakteriosin antara lain: jarum ose, bunsen, sprayer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, mikropipet (eppendorf) 1000 µl, *blue tip*, *waterbath*, spatula, autoklaf, erlenmeyer 500 ml, erlenmeyer 1000 ml, beaker glass 500 ml, spektrofotometer, timbangan analitik, centrifugasi suhu rendah tipe *Allegra “64R Centrifuge* merk *Beckman Coulter*, pipet volume 10 ml, bola hisap, membran filter 0,2 µm, cuvet, spatula, *magnetic stirrer*, hotplate, *yellow tip*, penjahit selofan, dan lemari pendingin. Peralatan yang digunakan untuk pemisahan bakteriosin antara lain ultrasentrifugasi tipe *Optima Max-XP Ultracentrifuge* merk *Beckman Coulter*, cuvet, eppendorf dan mikropipet merk eppendorf.

Alat-alat yang digunakan untuk uji karakterisasi bakteriosin dan aplikasi bakteriosin pada bakteri pembentuk histamin antara lain *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE), eppendorf, mikropipet merk eppendorf, *yellow tip*, *hot plate*, rak tabung reaksi, vorteks, *power supply*, jangka sorong atau penggaris, tabung reaksi, bunsen, cawan petri dan beaker glass 250 ml.

4.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif dan eksperimen. Metode deskriptif yang dilakukan pada penelitian ini, yaitu mendeskripsikan karakteristik bakteriosin *Lactobacillus casei* yang meliputi karakterisasi biologis (aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri pembentuk histamin), karakterisasi fisik (suhu dan lama pemanasan, serta pH) dan karakterisasi kimia (berat molekul bakteriosin). Metode deskriptif yang bersifat eksploratif, bertujuan untuk menggambarkan keadaan atau status fenomena.

Data yang terkumpul diklasifikasikan ke dalam kelompok data kualitatif dan data

kuantitatif. Data kualitatif digambarkan dengan kalimat, sedangkan data kuantitatif berupa angka-angka hasil perhitungan atau pengukuran, dijumlahkan dan diproses melalui analisis perhitungan untuk mengambil kesimpulan (Arikunto, 2006).

Metode eksperimen yang dilakukan pada penelitian ini, yaitu melakukan eksperimen dengan mengaplikasikan bakteriosin dengan konsentrasi yang berbeda pada bakteri pembentuk histamin yang selanjutnya diamati aktivitas hambat bakteriosin. Metode eksperimen merupakan salah satu metode statistik yang digunakan sebagai alat untuk meningkatkan dan melakukan perbaikan kualitas. Eksperimen berperan penting dalam mengembangkan proses dan dapat digunakan untuk menyelesaikan permasalahan dalam proses agar kinerja proses meningkat (Irawan dan Astuti, 2006). Penelitian eksperimen merupakan penelitian untuk menguji hipotesis berbentuk hubungan sebab-akibat melalui pemanipulasi variabel bebas (yaitu treatment) dan menguji perubahan perubahan yang diakibatkan oleh pemanipulasi tadi (variabel terikat) (Nazir, 2009).

Penelitian yang akan dilakukan terdiri dari 2 (dua) tahap, yaitu karakterisasi bakteriosin (ekstraksi bakteriosin, pemisahan bakteriosin, dan karakterisasi bakteriosin) dan aplikasi bakteriosin terhadap bakteri pembentuk histamin.

4.2.1 Tahap I : Karakterisasi Bakteriosin

a. Karakter Pertumbuhan *Lactobacillus casei* (Hadioetomo, 1990)

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui kurva pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* dan fase pertumbuhannya. Fase-fase yang terbentuk akan berguna untuk menentukan waktu generasi bakteri, khususnya fase eksponensial hingga fase pertumbuhan stasioner dimana bakteriosin

berakumulasi di dalam media kultur selama fase pertumbuhan eksponensial hingga fase pertumbuhan stasioner. Menurut Jimenez Diaz (1993) produksi bakteriosin terbaik pada saat mencapai akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Tahap kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengacu pada metode Hadioetomo, (1990). Kurva pertumbuhan bakteri dilakukan selama 24 jam inkubasi dan dilakukan sampling setiap 1 jam untuk mengetahui fase-fase yang ada. Sebanyak 5 % (v/v) dari kultur kerja ditanam dalam MRS Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri diikuti setiap jam dengan mengamati nilai kerapatan optik atau *optical density* (OD) dari starter pada media MRS dengan metode turbidimetrik dengan panjang gelombang 620 nm. Setelah didapatkan kurva pertumbuhan bakteri, langkah selanjutnya adalah dihitung kecepatan/laju pertumbuhan dan waktu generasi bakteri.

Menurut Brock dan Madigan (1991), pengetahuan mengenai kecepatan pertumbuhan bersifat penting dalam menentukan keadaan atau status kultur sebagai kesatuan. Jika satu dugaan waktu lipat-dua jumlah sel bakteri awal (No) pada waktu t_0 , konsentrasi akhir mikroorganisme (N_t) ialah:

$$N_t = No \times 2^{\frac{t}{T}}$$
 (1)

Dimana n adalah jumlah pembelahan sel pada waktu t . Persamaan

$$T = \frac{t}{n}$$
 (2)

mengekspresikan waktu lipat-dua atau waktu generasi. Istilah waktu lipat-dua menampilkan waktu generasi rata-rata dalam biakan sebagai kesatuan, biasanya ditentukan oleh kelipatan-dua masa mikroba dalam biakan. Sebaiknya waktu generasi ditentukan dengan perhitungan. Peningkatan massa sel ditentukan dalam interval waktu yang diketahui dan waktu generasi dihitung dari nilai yang diperoleh.

Persamaan (2) disusun kembali menjadi :

$$n = \frac{t}{g}$$

Kemudian dimasukkan ke dalam persamaan (1), maka

$$N_t = N_0 \times 2^n \quad (1) \quad N_t = N_0 \times 2^{tg} \quad (3)$$

Dengan mengkonversi menjadi bentuk logaritmik, maka diperoleh

$$g = \frac{t \ln 2}{\ln N_t - \ln N_0} = \frac{0,69 t}{\ln N_t - \ln N_0} \quad (4)$$

Persamaan (4) merupakan rumus untuk menghitung waktu generasi dari dua

pengukuran yang memberikan peningkatan masa pada waktu t. Pengukuran

harus dilakukan dalam kondisi konstan, dan sebaiknya sejumlah mikroorganisme

ditentukan sebagai berat kering. Untuk menghitung laju pertumbuhan spesifik

atau laju pertumbuhan eksponensial suatu mikroorganisme, digunakan bentuk

logaritmik dengan persamaan (3) :

$$\ln N_t = t \frac{\ln 2}{g} + \ln N_0 \quad (5)$$

Untuk fase pertumbuhan eksponensial, ekspresi $(\ln 2)/g$ konstan. Oleh karena

itu, pada persamaan (5) kita dapat menggantinya sehingga menghasilkan persamaan:

$$\ln N_t = (t + \ln N_0) \quad (6)$$

Ketika nilai t dipetakan pada absis dan nilai $\ln N_t$ pada ordinat, diperoleh garis

lurus dan konstan merupakan lereng dari garis lurus tersebut. Hal tersebut

menentukan laju pertumbuhan masa bakteri sebagai fungsi waktu. Oleh karena

itu disebut laju pertumbuhan spesifik (specific growth rate atau instantaneous

growth rate) konstan. Nilainya dapat ditentukan dengan grafik atau dengan

perhitungan dimana μ adalah konstanta kecepatan pertumbuhan :

$$\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,69}{g} \quad (7)$$

atau dapat dihitung langsung dari persamaan (6):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad (8)$$

dimana waktu t merupakan interval waktu t1 - t2 selama masa bakteri meningkat menjadi nilai Nt.

b. Pembuatan Kultur Kerja (Usmiati dan Marwati, 2007)

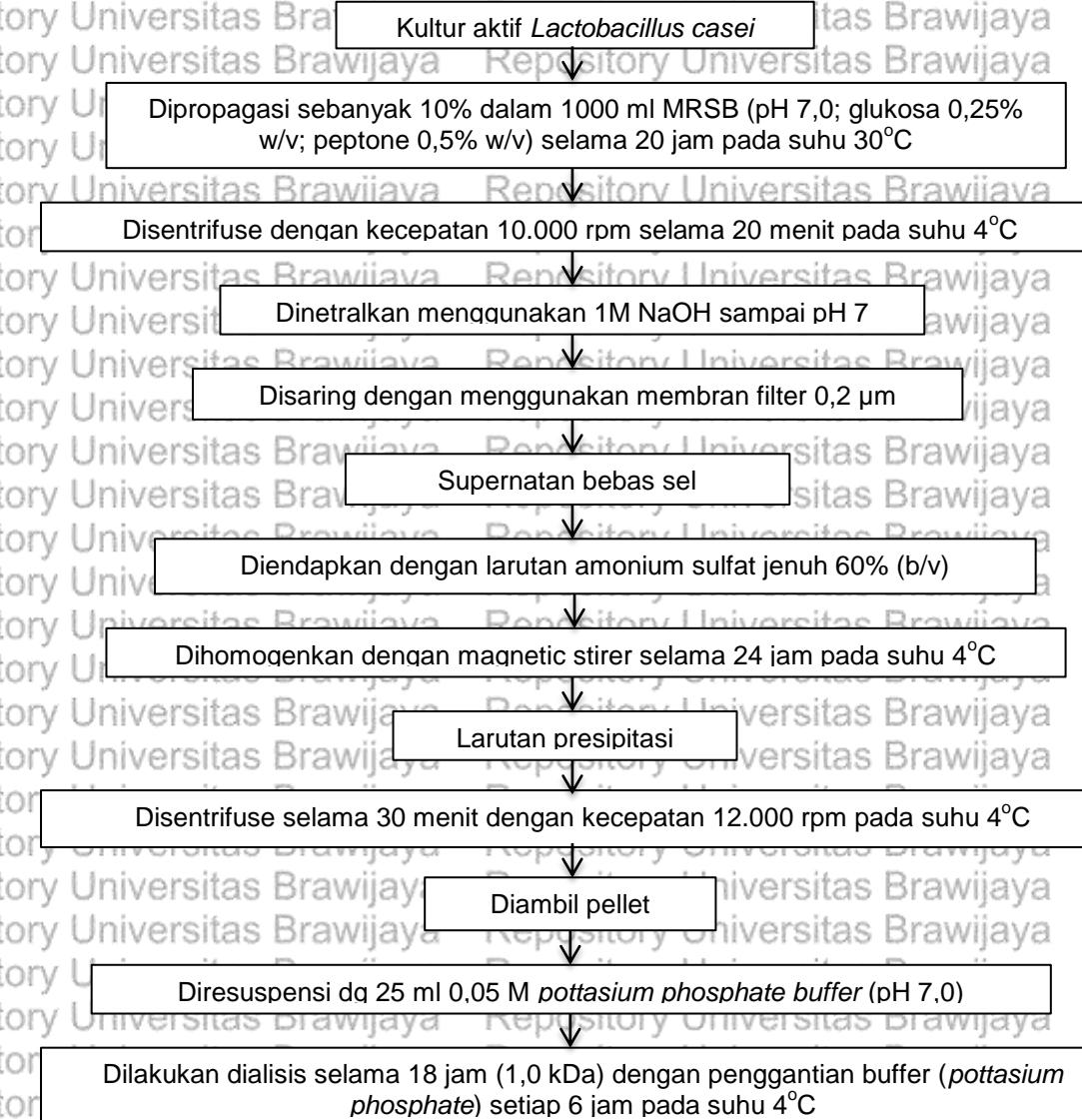
Pada penelitian menggunakan bakteri asam laktat, yaitu *Lactobacillus casei*. Isolat bakteri asam laktat yang digunakan dalam bentuk biakan agar miring yang diremajakan dengan MRS Broth yang ditambahkan yeast sebanyak 0,5% (b/v). Peremajaan atau aktivasi kultur *Lactobacillus casei* dilakukan dengan cara menumbuhkan satu ose isolat yang ditumbuhkan dalam media agar miring ke dalam 10 ml MRS Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu, diambil 1 ml kultur dari MRS Broth tersebut untuk ditumbuhkan dalam 10 ml MRS Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam sehingga didapatkan kultur kerja. Peremajaan bakteri juga dilakukan pada bakteri uji dengan menggunakan media TSA.

c. Ekstraksi Bakteriosin

Tahapan ekstraksi bakteriosin mengacu pada metode Ogunbanwo *et al.*, (2003). Kultur aktif *Lactobacillus casei* sebanyak 10% (v/v) dipropagasi dalam 1000 ml MRS Broth (pH 7,0; glukosa 0,25% w/v; peptone 0,5% w/v) selama 20 jam pada suhu 30°C. Kultur disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C dan dinetralkan menggunakan 1M NaOH sampai pH 7,0. Larutan yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan membran filter 0,2 µm untuk mendapatkan supernatan bebas sel. Tahapan presipitasi mengacu pada metode Ohmomo *et al.*, (2000). Supernatan bebas sel yang diperoleh dari proses ekstraksi diendapkan dengan larutan amonium sulfat jenuh 60% (b/v) dan dihomogenkan dengan *magnetic stirer* selama 24 jam pada suhu

4°C. Kemudian, larutan presipitasi disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan

12000 rpm pada suhu 4°C. Pelet dilarutkan dalam 25 ml 0,05 M *pottassium phosphate buffer* (pH 7,0). Pelet yang didapat dari presipitasi bakteriosin dengan ammonium sulfat didialisis selama 18 jam dengan menggunakan membran dialisis (1,0 kDa) dan buffer yang digunakan yaitu *pottassium phosphate buffer* (pH 7,0), selanjutnya dilakukan penggantian buffer setiap 6 jam pada suhu 4°C sehingga akan didapat ekstrak bakteriosin (Ogunbawo *et al.*, 2003). Berikut adalah prosedur ekstraksi bakteriosin pada Gambar 5.



Gambar 5. Prosedur ekstraksi bakteriosin

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

d. Pemisahan Bakteriosin (Fadda et al., 2010)

Setelah dilakukan dialisis, tahapan selanjutnya yang dilakukan adalah pemisahan bakteriosin dengan menggunakan ultrasentrifugasi. Larutan bakteriosin hasil dialisis disentrifugasi dengan ultrasentrifugasi pada kecepatan 50.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dan didapatkan supernatan sebagai ekstrak bakteriosin. Ultrasentrifugasi dilakukan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya.

e. Karakterisasi Bakteriosin

Karakteristik Biologi (Aktivitas Hambat Bakteriosin)

Pengujian daya hambat bakteriosin terhadap bakteri uji menggunakan metode difusi cakram berdasarkan modifikasi Nurlia (1997) dan Nurliana (2009).

Bakteri pembentuk histamin yang telah aktif pada media *Nutrient Broth* diresuspensi ke dalam 5 mL garam fisiologis (NaCl 0,85%) yang kemudian dibandingkan kekeruhannya menggunakan standar *McFarland No. 9* (setara dengan kekeruhan 10^9 sel/bakteri/mL). Selanjutnya, suspensi bakteri yang sudah dibandingkan kekeruhannya diencerkan dalam media *Buffered Pepton Water* yang steril dengan target populasi mencapai populasi 10^6 sel/mL (Usmiati et al., 2009).

Media MHA steril dituang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat pada suhu kamar. Media MHA yang sudah memadat diinokulasikan dengan 0,1 ml suspensi bakteri uji dan diratakan dengan hockey stick, kemudian didiamkan sampai kering selama 15 menit.

Cakram kertas ditetes ekstrak bakteriosin sebanyak 50 µl. Selanjutnya, cakram kertas diletakkan di atas media MHA yang telah diinokulasikan bakteri uji, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan bakteri uji.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Langkah selanjutnya yaitu melakukan pengukuran diameter hambat atau diameter zona bening (mm) dengan menggunakan jangka sorong atau penggaris. Pengukuran diameter zona bening diukur sebanyak tiga kali di daerah yang berbeda dan hasilnya kemudian dirata-rata.

Karakterisasi Fisik

Karakterisasi fisik yang dilakukan pada ekstrak bakteriosin meliputi stabilitas terhadap suhu dan pH.

Stabilitas Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan

Uji ini dilakukan dengan memanaskan bakteriosin sebanyak 400 μ l pada suhu 45°C, 70°C, dan 95°C selama 15, 30 dan 45 menit. Selanjutnya larutan bakteriosin diuji aktivitas hambat dengan metode difusi cakram.

Stabilitas Terhadap pH

Uji ini dilakukan dengan menambahkan 0,1 M NaOH atau 0,1 M HCl untuk membuat perbedaan level pH dari 2 sampai 9. Volume ekstrak bakteriosin yang digunakan yaitu 400 μ l. Kemudian, larutan bakteriosin dan NaOH atau HCl dihomogenkan dan didiamkan beberapa menit sebelum diuji aktivitas hambat terhadap bakteri pembentuk histamin.

Karakterisasi Kimia (Berat Molekul Bakteriosin)

Penentuan berat molekul bakteriosin menggunakan *Sodium Deodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) berdasarkan metode Fatchiyah et al., (2006).

- **Persiapan Separating and Stacking gel**

- Plate gel dibuat dengan cara merangkai 2 plate kaca jarak \pm 1 mm.
- Dibuat 2 lapis gel yaitu gel sebagai pengumpul sampel (stacking gel) dan gel sebagai media untuk memisahkan protein (separating gel). Campuran

Repository Universitas Brawijaya
separating gel 45μ dimasukkan ke dalam plate (tempat lapisan gel),

ditunggu selama 10 menit sampai separating gel terbentuk.

- Stacking gel dimasukkan di atas separating gel dan dipasang sisir untuk

membuat sumuran, kemudian didiamkan selama 30 menit sampai

terbentuk gel dan sisir diangkat dengan hati-hati.

- Plate dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan buffer elektroforesis ke dalam chamber elektroforesis.

- **Injeksi Sampel Pada Sumur Gel**

- Plate yang berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis.

- Running buffer dituang sampai gel terendam di bagian ats dan bawah.

- Sebanyak 20μ l bakteriosin ditambah dengan 20μ l Reduksi Sampel

Buffer (RSB) kemudian divortex untuk menghomogenkan, selanjutnya

dipanaskan dengan pemanas air suhu 100°C selama 5 menit. Setelah

dingin, sampel dimasukkan ke dalam sumuran elektroforesis, volume ± 40

μl untuk setiap sumur menggunakan Hamilton syringe. Syringe dibilas

sampai 3 x menggunakan aquades atau dengan running buffer sebelum

dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel

berikutnya.

- **Running Sampel**

Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan power supply. Running

dilakukan pada constan current 20 mA selama $40-50$ menit atau sampai

tracking dye mencapai jarak $0,5 \text{ cm}$ dari dasar gel. Setelah selesai, running

buffer dituang dan gel diambil dari plate.

- **Pewarnaan dan pencucian**

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining

selama $30-60$ menit, penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
dalam larutan desstaining, digoyang-goyangkan dengan shaker sampai gel menjadi jernih.

• **Pembuatan kurva standar berat molekul**

- Pergerakan masing-masing protein standar diukur dan dihitung nilai Rfnya
- Menggambarkan kurva standar berat molekul yang diperoleh dengan mengeplotkan nilai Rf pada sumbu X dan log dari berat molekul pada sumbu Y. Kemudian dihitung persamaan garis linier $y = a + bx$.

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tepi awal (a)}}{\text{Jarak pergerakan akhir tracking (b)}}$$

• **Pengukuran berat molekul protein sampel**

Jumlah band protein dihitung dan diamati dengan cermat. Masing-masing band protein dihitung nilai Rfnya, dari setiap nilai Rf yang diperoleh dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan garis linier dari kurva standar berat molekul, hasil yang diperoleh dicatat dan masukkan dalam tabel.

4.2.2 Tahap II : Aplikasi Bakteriosin pada Bakteri Pembentuk Histamin

Pada tahap II ini dilakukan penerapan aplikasi bakteriosin *Lactobacillus casei* dengan menguji daya hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* pada konsentrasi ekstrak bakteriosin yang berbeda terhadap bakteri pembentuk histamin.

Bakteri pembentuk histamin yang digunakan, yaitu *Pseudomonas sp.*, *Proteus morganii* (bakteri Gram Negatif) dan *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.* (bakteri Gram Positif). Perlakuan yang digunakan yaitu konsentrasi ekstrak bakteriosin ($2 \times \text{MBC}$ (A) ; $3 \times \text{MBC}$ (B) ; $4 \times \text{MBC}$ (C), $5 \times \text{MBC}$ (D)). Untuk menentukan konsentrasi ekstrak bakteriosin yang akan digunakan, sebelumnya dilakukan penentuan Minimum Inhibitory Concentration dan Minimum Bactericidal Concentration (Bloomfield, 1991) pada ekstrak bakteriosin.

Pengujian daya hambat bakteriosin pada konsentrasi ekstrak bakteriosin yang berbeda terhadap bakteri pembentuk histamin menggunakan metode difusi cakram berdasarkan modifikasi Nurlia (1997) dan Nurliana (2009). Bakteri pembentuk histamin yang telah aktif pada media *Nutrient Broth* diresuspensi ke dalam 5 mL garam fisiologis (NaCl 0,85%) yang kemudian dibandingkan kekeruhannya menggunakan standar *Mc Farland No. 9* (setara dengan kekeruhan 10^9 sel bakteri/mL). Selanjutnya, suspensi bakteri yang sudah dibandingkan kekeruhannya diencerkan dalam media *Buffered Pepton Water* yang steril dengan target populasi mencapai populasi 10^6 sel/mL (Usmiati et al., 2009).

Media MHA steril dituang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat pada suhu kamar. Media MHA yang sudah memadat diinokulasikan dengan 0,1 ml suspensi bakteri uji dan diratakan dengan hockey stick, kemudian didiamkan sampai kering selama 15 menit. Cakram kertas ditetesi ekstrak bakteriosin sebanyak 50 μ l. Selanjutnya, cakram kertas diletakkan di atas media MHA yang telah diinokulasikan bakteri uji, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan bakteri uji. Langkah selanjutnya yaitu melakukan pengukuran diameter hambat atau diameter zona bening (mm) dengan menggunakan jangka sorong atau penggaris. Pengukuran diameter zona bening diukur sebanyak tiga kali di daerah yang berbeda dan hasilnya kemudian dirata-rata.

a. Penentuan **Minimum Inhibitory Concentration** dan **Minimum Bactericidal Concentration** (Bloomfield, 1991) pada Ekstrak Bakteriosin.

Pengujian (*Minimum Inhibitory Concentration* dan *Minimum Bactericidal Concentration*) terhadap bakteri uji dilakukan pada ekstrak bakteriosin. Metode Bloomfield (1991) digunakan untuk memproses data yang didapatkan dari aktivitas antimikroba ekstrak pada setiap masing-masing ekstrak untuk menentukan nilai MIC dan MBC. Pada Gambar 5 dijelaskan bahwa nilai logaritma dari konsentrasi ekstrak (M_0) pada sumbu X dan nilai kuadrat diameter zona hambat (Z^2) pada sumbu Y. Nilai Mt adalah titik dimana garis regresi $Y = aX + b$ memotong sumbu X. MIC adalah nilai perkalian dari $0,25 \times Mt$ dimana MBC adalah $4 \times MIC$ atau sama dengan nilai Mt. Konsentrasi ekstrak bakteriosin yang digunakan, yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% dan 90%.



Gambar 6. Grafik untuk menentukan MIC

Setelah dilakukan penentuan MIC dan MBC ekstrak bakteriosin, maka didapatkan nilai MIC dan MBC ekstrak bakteriosin dimana nilai ini digunakan untuk menentukan konsentrasi perlakuan yang akan dilakukan.

4.3 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan konsentrasi ekstrak bakteriosin yang berbeda dengan tiga kali ulangan. Peubah yang diamati adalah aktivitas hambat ekstrak bakteriosin. Selanjutnya, dilakukan pengolahan data penelitian dengan menggunakan software SPSS. Data yang telah dianalisa selanjutnya dibahas dengan literatur yang mendukung.

berlangsung lambat. Fase kedua adalah fase eksponensial dimana pada fase ini pertumbuhan bakteri berlangsung secara cepat. Fase eksponensial terjadi pada jam ke-7 sampai pada jam ke-19. Fase ketiga adalah fase stasioner dimana pada fase ini jumlah sel bakteri yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Fase stasioner terjadi pada jam ke-20 sampai jam ke-24. Fase berikutnya adalah fase kematian dimana jumlah sel bakteri mengalami penurunan karena nutrien dalam media dan cadangan energi dalam sel mulai menipis.

Berdasarkan kurva pertumbuhan *Lactobacillus casei* yang didapat, diperoleh juga karakter pertumbuhan *Lactobacillus casei* yang dapat dilihat pada Tabel 4. Perhitungan karakter pertumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 1. Untuk mendapatkan data karakter pertumbuhan pada Tabel 4, diliinear dari kurva pertumbuhan bakteri (Gambar 7) dengan cara logaritma dari persamaan eksponensial $\ln N_t = t \frac{\ln 2}{g} + \ln N_0$ sehingga diperoleh persamaan linier $y = 0,1493x - 0,7629$.

Tabel 4. Karakter Pertumbuhan *Lactobacillus casei*

| Karakter Pertumbuhan | Nilai |
|--|---------|
| Kecepatan pertumbuhan maksimal (per jam) | 0,1493 |
| Lag time (jam) | 5,1098 |
| Nilai maksimal jumlah sel (A) | 2,002 |
| Waktu generasi (jam) | 13,4098 |
| Konstanta laju pertumbuhan spesifik | 0,0517 |

Kecepatan pertumbuhan spesifik didasarkan pada persamaan yang berlaku pada fase pertumbuhan logaritmik (Pramono, 2003). Kecepatan pertumbuhan spesifik *Lactobacillus casei* adalah 0,0517 per jam. Sedangkan

waktu generasi *Lactobacillus casei* adalah 13,4 jam. Waktu generasi merupakan waktu yang diperlukan mikroorganisme untuk meningkatkan jumlah sel menjadi dua kali lipat jumlah semula. Pada fase eksponensial terjadi peningkatan jumlah sel dan digunakan untuk menentukan waktu generasi. Beberapa contoh

waktu generasi pada suhu pertumbuhan yang optimal antara lain 30 menit untuk *Bacillus cereus*, 20 menit untuk *Escherichia coli* dan *Salmonella*, dan 10 menit untuk *Clostridium perfringens* (Yudhabuntara, 2003). Waktu generasi pada setiap bakteri tidak sama, ada yang hanya memerlukan 20 menit sampai berjam-jam atau berhari-hari (Sumarsih, 2003). Semakin cepat lag time, maka semakin cepat waktu generasi bakteri. Pada bakteri uji *Pseudomonas sp* memiliki kecepatan

pertumbuhan sebesar $0,136 \text{ jam}^{-1}$ (Diswanto dan Edwan, 2015). Hal ini menandakan bahwa kecepatan pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* lebih cepat dari kecepatan pertumbuhan bakteri uji *Pseudomonas sp* yang berarti bahwa dimungkinkan pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas sp*. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki waktu generasi selama 15-20 menit (Pelczar and Chan, 2006).

Hal ini menandakan bahwa waktu generasi dari *Lactobacillus casei* lebih lambat dari waktu generasi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus sp*. Berdasarkan Sterrit dan Lester (1988) dalam Microbiology for Environmental and Public Health.

Engineers, interaksi antar mikroorganisme pada sistem batch akan didominasi oleh interaksi yang bersifat kompetisi. Interaksi ini mengakibatkan spesies yang tumbuh lebih cepat akan menguasai spesies yang pertumbuhannya lebih lambat, kecuali laju pertumbuhannya identik.

Selama pertumbuhan bakteri asam laktat, produksi maksimum terjadi pada fase akhir eksponensial atau awal fase stasioner. Waktu inkubasi yang digunakan adalah pada jam ke-19 dimana pada fase ini terjadi produksi bakteriosin. Menurut Jimenez Diaz (1993) produksi bakteriosin terbaik pada saat mencapai akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Pada penelitian

Suprihanto (2009) menyatakan bahwa fase awal eksponensial *Lactobacillus casei* terjadi pada jam ke-11. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian dari

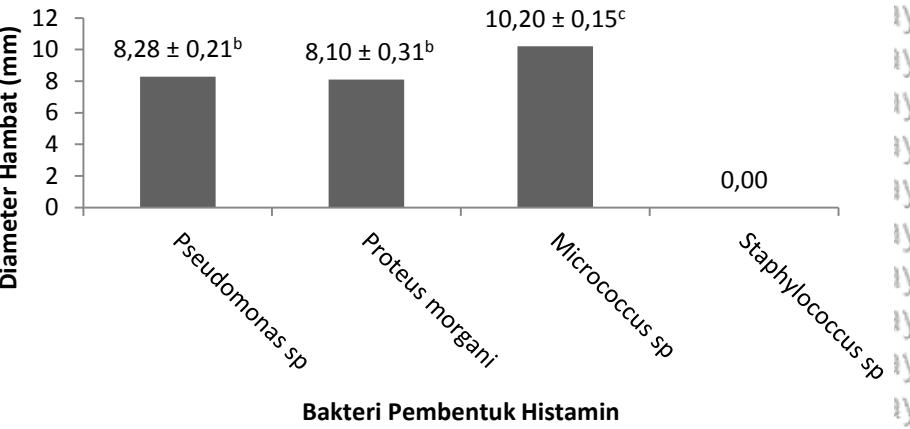
Repository Universitas Brawijaya
Harmayani *et al.*, (2001) yang menyatakan bahwa ketiga isolat potensial (*Lactobacillus* sp. Dad 13, *L. acidophilus* D2, *L. plantarium* Mut &) memasuki fase logaritmik akhir (awal stasioner) pada jam ke 16-18 inkubasi. Bakteriosin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh sel yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri terutama bakteri gram positif (Hozapfel *et al.*, 1995). Schannel *et al.*, (1998) juga menyatakan bahwa bakteriosin merupakan metabolit ekstraseluler yang disintesis dalam ribosom sel BAL selama pertumbuhan fase eksponensial, biasanya mengikuti pola sintesis protein. Bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat, didefinisikan sebagai produk primer atau produk modified yang diproduksi ekstraseluler, disintesis oleh ribosom bakteri yang dapat mempunyai spektrum yang relatif sempit dalam aktivitas bakterisidal (Sriwira dan Intarapichet, 2005). Bakteriosin disintesis selama fase pertumbuhan eksponensial. Aktivitas bakteriosin menurun apabila waktu inkubasi yang memanjang setelah fase stasioner dikarenakan protease dibebaskan dari sel pada saat sel memasuki fase kematian (Nurhajati *et al.*, 2012).

5.2 Karakterisasi Bakteriosin

5.2.1 Karakterisasi Biologi Bakteriosin

Hasil uji aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap masing-masing bakteri uji ditunjukkan dengan adanya diameter hambat. Diameter hambat yang terbentuk dapat berupa zona bening di sekeliling sumur yang menunjukkan sifat bakterisidal (membunuh bakteri) maupun zona semu yang menunjukkan sifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikroba). Zona bening terbentuk karena adanya metabolit sekunder atau senyawa aktif antimikroba lainnya yang dihasilkan. Menurut Ray (1996) terdapat dua macam

zona bening yang dihasilkan oleh aktivitas senyawa antibakteri yaitu zona bening dengan batas tepi lingkaran yang tegas dan jelas disebabkan oleh aktivitas bakteriosin, sedangkan zona bening dengan tepi lingkaran yang keruh disebabkan aktivitas asam. Terbentuknya zona bening dengan tepi lingkaran yang keruh disebabkan semakin jauh difusi asam dalam media agar, maka konsentrasi asam yang terdapat dalam supernatan semakin rendah sehingga dapat mengakibatkan aktivitas hambat mengalami penurunan akibat asam. Terbentuknya zona bening yang tegas dan jelas pada bakteriosin disebabkan karena bakteriosin memiliki sifat *single hit inactivation* dimana satu molekul bakteriosin akan membunuh satu sel bakteri indikator. Hasil uji aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* dapat dilihat pada Gambar 8.



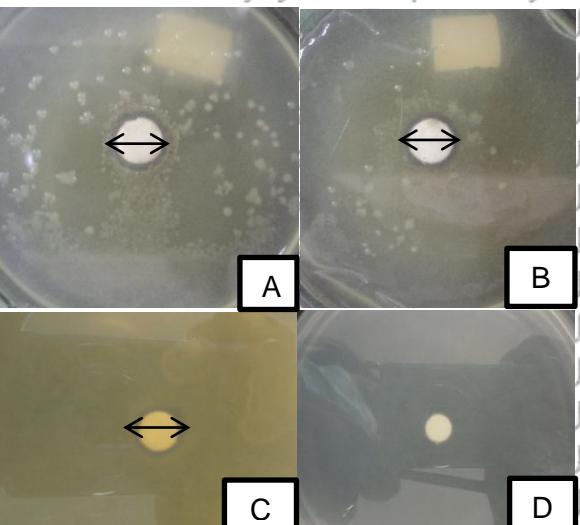
Gambar 8. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei*

Hasil analisis keragaman aktivitas hambat ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* pada Lampiran 3 menunjukkan bahwa perlakuan antar bakteri pembentuk histamin berpengaruh nyata terhadap diameter hambat bakteriosin dan interaksi keduanya ($p<0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji

BNT. Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil 5% didapatkan bahwa perlakuan bakteri uji berbeda nyata antar bakteri pembentuk histamin tetapi tidak berbeda nyata pada bakteri *Pseudomonas sp* dan *Proteus morgani*. Perbedaan aktivitas hambat dikarenakan bakteriosin mempunyai aktivitas hambat yang spesifik, dan biasanya mempunyai hubungan kekerabatan (filogenik) dekat dengan bakteri penghasil bakteri tersebut, serta tergantung perbedaan jenis dinding sel bakteri yang dihambat, yang berpengaruh pada ketahanan suatu bakteri terhadap zat antimikroba, karena perbedaan struktur dinding sel. Pada penghambatan bakteri *Staphylococcus sp* tidak terdapat zona bening sehingga dapat dinyatakan bahwa bakteriosin *Lactobacillus casei* tidak dapat menghambat bakteri *Staphylococcus sp* dikarenakan bakteri *Staphylococcus sp* memiliki daya tahan terhadap asam dan memiliki dinding sel yang kuat (terikat secara kovalen) sehingga bakteri ini lebih tahan terhadap asam dan zat antagonik lain yang dihasilkan *Lactobacillus casei* (Suseno et al, 2000).

Berdasarkan Ela et al., (1996), kriteria penetapan aktivitas antibakteri yaitu antibakteri aktif dan sangat aktif yang memiliki zona hambat > 11 mm, aktif sedang yang memiliki zona hambatan 6-11 mm, dan tidak aktif yang memiliki zona hambatan < 6 mm. Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap bakteri uji memiliki aktivitas hambat sedang dimana memiliki diameter hambat antara 6-11 mm. Berikut adalah gambar hasil aktivitas hambat bakteriosin dengan adanya diameter hambat atau zona bening dapat dilihat pada Gambar 9.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya



Gambar 9. Hasil diamater hambat bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap bakteri pembentuk histamin

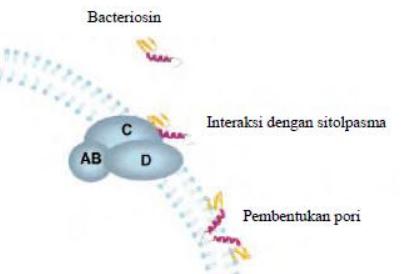
Pseudomonas sp, *Proteus morganii* dan *Micrococcus sp* merupakan bakteri pembentuk histamin dimana mampu menghasilkan enzim *L-Histidine Decarboxylase*. Berdasarkan hasil aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri pembentuk histamin dapat disimpulkan bahwa ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin. Penghambatan enzim *L-Histidine Decarboxylase* mengakibatkan tertundanya atau tidak terbentuknya produk sehingga mengakibatkan pengurangan atau bahkan tidak dihasilkannya histamin (Wendakoon dan Sakaguchi, 1995). Savadogo *et al.* (2006) menyatakan bahwa umumnya bakteriosin adalah peptida-peptida kationik yang terdapat dalam bentuk substansi yang bersifat hidrofobik atau amphifilik dan membran bakteri merupakan target utama dari aktivitas yang dilakukan oleh bakteriosin, yaitu aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri perusak dan pembusuk. Pada penelitian Mangunwardoyo *et al.* (2007) menyebutkan bahwa *Micrococcus diversus* memiliki kadar histamin sebesar 102,52 mg/100ml dan *Staphylococcus spp* memiliki kadar histamin sebesar 124,37 mg/100ml.

Keterangan :
(A) *Pseudomonas sp*
(B) *Proteus morganii*
(C) *Micrococcus sp*
(D) *Staphylococcus sp*

Aktivitas antimikroba BAL menyebabkan adanya perubahan dinding sel pada bakteri patogen sehingga mengakibatkan lisis. Adanya suatu zat antimikroba yang dihasilkan BAL mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sitoplasma pada bakteri uji sehingga terjadi kebocoran zat nutrisi dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim bakteri patogen. Terhambatnya kerja enzim bakteri patogen akan menyebabkan denaturasi protein sel serta perusakan sistem metabolisme dalam sel sehingga yang berakibat pada kematian pada bakteri patogen (Wisti *et al.*, 2014). Ogunbanwo *et al.* (2003) menyatakan bahwa bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* dapat menghambat bakteri *E. coli*, *S. thypimurium* dan *L. monocytogenes*. Dua isolat BAL (*L. casei* LA17 dan *Lactobacillus paracasei* LA02) dari produk ikan fermentasi asal Malaysia menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* dan *Eschericia coli* (Liasi *et al.*, 2009). Bakteriosin pada *Pediococcus acidilactici* F-11 yaitu pediosin mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin *Morganella morganii* (Rinto, 2010).

Bakteriosin dapat merusak permeabilitas membran sel bakteri dengan membentuk pori pada sel bakteri sehingga membran sel akan mengalami kebocoran. Terjadinya kebocoran akan menyebabkan terganggunya kestabilan membran sel sehingga pertumbuhan sel bakteri akan terhambat dan sel bakteri akan mengalami kematian (Jack *et al.*, 1995). Bakteriosin akan mempengaruhi membran, sintesis DNA dan sintesis protein. Umumnya bakteriosin menunjukkan aktivitas bakterisidal atau bakteriostatik terhadap bakteri lain yang sangat erat dengan strain penghasil. Mekanisme utama bakteriosin, yaitu pembentukan pori-pori dalam membran sitoplasma atau penghambatan biosintesis dinding sel dan aktivitas enzim dalam sel target (Chotiah, 2013). Mekanisme penghambatan bakteriosin terhadap bakteri target dapat dilihat pada Gambar 10.

Gambar 10. Mekanisme Aksi Bakteriosin Merusak Membran Sel Bakteri Patogen(Drider et al., 2006)



De Vuyst dan Vandame, (1994) menyatakan bahwa target utama bakteriosin adalah membran sitoplasma sel bakteri melalui perusakan permeabilitas membran dan menghilangkan *proton motive force* (PMF) sebagai reaksi awal, sehingga menghambat pembentukan energi dan biosintesis asam nukleat. Secara umum bakteriosin mempunyai kemampuan melawan bakteri lain dengan efek bakterisidal dengan mekanisme sebagai berikut : (a) molekul bakteriosin kontak dengan membran sel, (b) mengganggu potensial membran sitoplasma dengan destabilisasi sehingga sel menjadi tidak kuat, dan (c) ketidakstabilan membran sel mengakibatkan pembentukan lubang atau pori pada membran dengan mengganggu PMF. Pembentukan lubang pada sitoplasma merupakan akibat adanya bakteriosin yang menyebabkan terjadinya perubahan gradien potensial membran (DP) dan pelepasan molekul intraseluler maupun masuknya substansi ekstraseluler (dari lingkungan). Efeknya pertumbuhan sel terhambat dan menyebabkan proses kematian sel yang sensitif terhadap bakteri (Usmiati dan Nur, 2011).

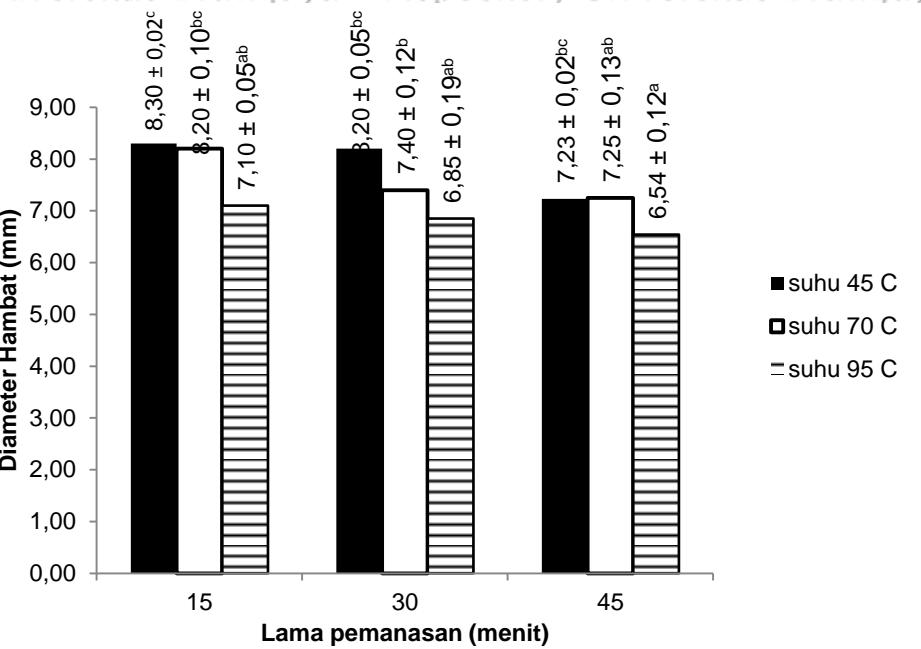
5.2.2 Karakterisasi Fisik Bakteriosin

Karakterisasi bakteriosin dilakukan untuk menentukan sifat dari bakteriosin terhadap pengaruh perlakuan lingkungan yaitu suhu dan pH. Dengan

mengetahui sifat bakteriosin berdasarkan pH dan suhu, dapat bermanfaat dalam proses pengolahan dan pengawetan produk perikanan. Pada tahap karakterisasi bakteriosin ini dilakukan pada bakteri pembentuk histamin yang memiliki diameter hambat tertinggi pada masing-masing jenis bakteri Gram Negatif, yaitu *Pseudomonas sp* dan jenis bakteri Gram Positif, yaitu *Micrococcus sp*.

a. Stabilitas Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan

Penelitian mengenai stabilitas bakteriosin terhadap suhu dan lama pemanasan sangat penting dikaji apabila bakteriosin akan diaplikasikan pada bahan makanan. Penggunaan bakteriosin sebagai pengawet alami dalam makanan perlu mempertimbangkan pula sifat-sifat bakteriosin tersebut mengingat pengolahan makanan sering melibatkan suhu tinggi, suhu rendah, pengeringan, penyimpanan yang lama, dan sebagainya (Nugroho dan Endang, 2003). Dari hasil pengujian karakteristik bakteriosin terhadap suhu ini, didapatkan aktivitas hambat bakteriosin pada bakteri *Pseudomonas sp* yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 11 dan pada bakteri *Micrococcus sp* yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 12.

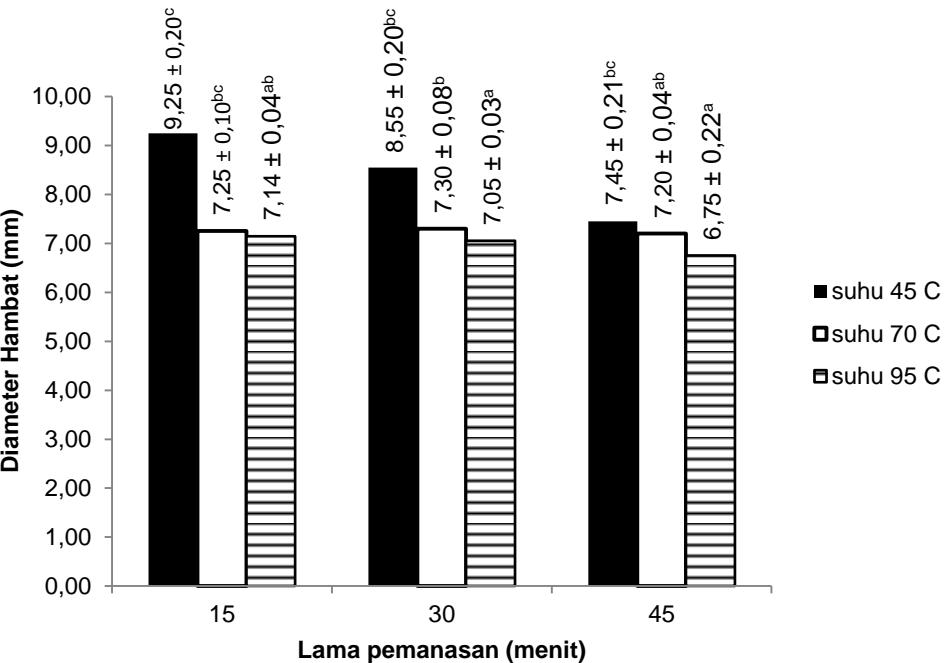


Keterangan :

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($p > 0,05$)

Gambar 11. Grafik aktivitas hambat bakteriosin terhadap perlakuan suhu dan lama pemanasan pada bakteri *Pseudomonas* sp



Keterangan :

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($p > 0,05$)

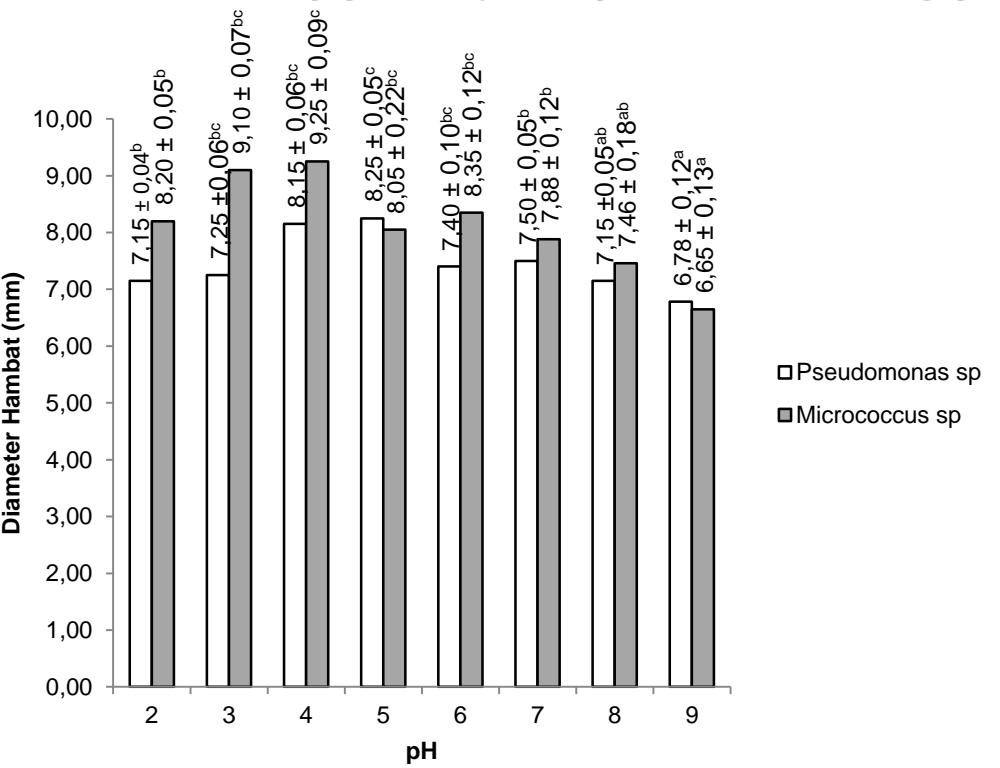
Gambar 12. Grafik aktivitas hambat bakteriosin terhadap perlakuan suhu dan lama pemanasan pada bakteri *Micrococcus* sp

Hasil analisis keragaman faktor suhu dan lama pemanasan pada Lampiran 3 menunjukkan bahwa peningkatan suhu pemanasan dan lama pemanasan yang digunakan berpengaruh nyata terhadap diameter hambat bakteriosin dan interaksi keduanya ($p<0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji BNT. Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil 5% didapatkan bahwa kombinasi suhu dan waktu antar perlakuan memiliki perbedaan yang nyata. Pada perlakuan kombinasi suhu 45°C selama 30 menit dan 45 menit, dan suhu 70 °C selama 15 menit tidak berbeda nyata.

Bakteriosin *Lactobacillus casei* tidak kehilangan aktivitas hambat pada kisaran suhu 45°C, 70°C dan 95°C, namun demikian bakteriosin ini mengalami penurunan aktivitas hambat terhadap kedua bakteri pembentuk histamin, yaitu *Pseudomonas sp* dan *Micrococcus sp*. Aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri *Pseudomonas sp* dan *Micrococcus sp* tertinggi terletak pada suhu 45°C selama 5 menit dengan diameter hambat sebesar 8,30 mm dan 9,25 mm, sedangkan aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri *Pseudomonas sp* dan *Micrococcus sp* terendah terletak pada suhu 90°C selama 45 menit dengan diameter hambat sebesar 6,54 mm dan 6,75 mm.

Penurunan aktivitas hambat bakteriosin terus berlanjut seiring dengan meningkatnya suhu pemanasan dan lama yang digunakan. Semakin tinggi suhu yang digunakan, maka semakin kecil diameter hambat bakteriosin terhadap bakteri pembentuk histamin, begitu pula dengan waktu. Semakin lama waktu yang digunakan, maka semakin kecil diameter hambat bakteriosin terhadap bakteri pembentuk histamin. Penurunan aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap bakteri *Pseudomonas sp* pada suhu 45 °C sebesar 14,79% atau setara dengan 0,0356 mm/menit, pada suhu 70 °C sebesar 13,10% atau setara dengan 0,0315 mm/menit, pada suhu 95 °C sebesar 8,56% atau setara dengan 0,0816 mm/menit. Sedangkan penurunan aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap

Gambar 13.



Keterangan :

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$)Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($p > 0,05$)

Gambar 13. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin terhadap pH

Hasil analisis keragaman faktor pH pada Lampiran 4 menunjukkan bahwa peningkatan nilai pH yang digunakan berpengaruh nyata terhadap diameter hambat bakteriosin dan interaksi keduanya ($p < 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji BNT. Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil 5% yang dilakukan, didapatkan bahwa perlakuan pH berbeda nyata dengan yang lain.. Perlakuan pH 3,4 dan 6 tidak berbeda nyata pada bakteri *Pseudomonas sp.*. Pada perlakuan pH 3,5,6 tidak berbeda nyata pada bakteri *Micrococcus sp.*.

Bakteriosin *Lactobacillus casei* pada bakteri uji *Pseudomonas sp* mempunyai aktivitas optimum pada pH 5 dengan diameter hambat sebesar 8,25

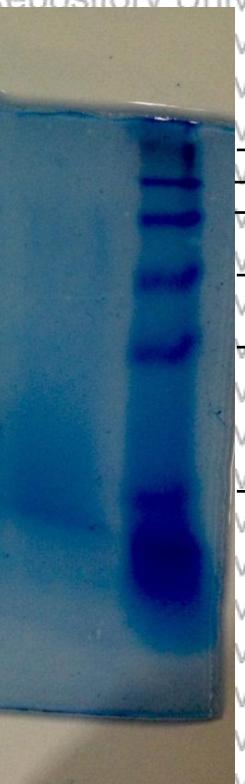
Repository Universitas Brawijaya
mm, sedangkan pada bakteri uji *Micrococcus sp* memiliki aktivitas optimum pada pH 4 dengan diameter hambat sebesar 9,25 mm. Aktivitas daya hambat bakteriosin berkurang seiring dengan meningkatnya nilai pH (mendekati pH basa) dan aktif pada pH asam. Menurut Jack *et al.* (1996), semakin tinggi pH yang diberikan maka aktivitas bakteriosin akan berkurang, hal ini terlihat pada bakteriosin piscicolin yang aktivitas bakteriosinya menghilang pada pH tinggi mendekati pH 8. Hasil penelitian Mehta *et al.* (1983) mendapatkan bahwa bakteriosin dihasilkan bakteri *Lactobacillus acidophilus* mempunyai aktivitas optimum pada kisaran nilai pH 4-5. Hilangnya aktivitas hambat bakteriosin pada pH basa dimungkinkan karena terdegradasinya bakteriosin atau rusaknya bakteriosin akibat dari pH. Menurut Parente *et al.*, (1994), hilangnya aktivitas bakteriosin pada pH 10 kemungkinan disebabkan terdegradasi oleh enzim proteolitik, agregasi protein, diserap oleh sel penghasil dan regulasi umpan balik. Hal ini diperkuat oleh Avonts *et al.*, (2004) degradasi bakteriosin terjadi seiring dengan fase kematian sel penghasil. Awalnya sel mengalami lisis kemudian diikuti dengan akumulasi protease intraseluler yang menyebabkan rusaknya bakteriosin.

5.2.3 Karakterisasi Kimia (Berat Molekul)

Prinsip penggunaan metode gel poliakrilamid ini adalah migrasi komponen akrilamida dengan N,N'-bisakrilamida. Kisi-kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul untuk mengoptimalkan kondisi migrasi komponen protein yang diatur berdasarkan konsentrasi atau rasio akrilamid dengan bisakrilamid. Metode ini digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein selain untuk memonitor pemurnian protein (Wilson dan Walker, 2000).

Deterjen ionik (SDS) yang memiliki muatan negatif akan mendenaturasi sebagian besar struktur kompleks protein yang secara kuat tertarik ke anoda sehingga

Keterangan : B = bakteriosin /a
M = Marker /a



148
98
64
50
36
22
16
6

Gambar 14. Hasil elektroforesis SDS-PAGE bakteriosin *Lactobacillus casei*

Pada Gambar 14 di atas menunjukkan bahwa bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki berat molekul 14,34 kDa dengan nilai (a) sebesar 5,5 dan nilai (b) sebesar 8. Berat molekul bakteriosin spesies *Lactobacillus* berbeda-beda, memiliki range berat molekul yang lebar. Bakteriosin dari *Lactobacillus acidophilus* IFO 3205 (Hosono et al, 1977) dan lactacin B dari *Lactobacillus acidophilus* N2 termasuk salah satu yang terkecil dengan berat molekul 3,5 kDa dan 6,5 kDa. Untuk lactocin 27 memiliki berat molekul 12,4 kDa dilaporkan oleh Upreti dan Hinsdill, (1975). Helveticin J memiliki berat molekul 37 kDa (Joerger

menunjukkan berat molekul yang besar. Lee dan Kim, (2011) menyatakan berdasarkan ukuran, morfologi dan fisik, bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Lactobacillus casei* dikelompokkan dalam bakteriosin kelas III, umumnya berukuran besar (>10 kDa), dan tidak tahan panas yang terdiri dari dua tipe. Tipe IIIa adalah bakteriolisin yang merupakan enzim bakteriolitik. Contoh yang banyak dipelajari pada tipe ini adalah lisostaphin. Tipe IIIb adalah bakteriosin tipe non-litik, salah satunya adalah helvetisin J (37 kDa) yang diproduksi oleh *Lactobacillus helveticus*. Untuk perhitungan berat molukel dapat dilihat pada Lampiran 4.

5.3 Aplikasi Bakteriosin pada Bakteri Pembentuk Histamin

5.3.1 Penentuan MIC dan MBC

Pada tahap ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi ekstrak bakteriosin yang akan digunakan berdasarkan nilai MIC dan MBC sehingga mendapatkan konsentrasi terendah bakteriosin *Lactobacillus casei* dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin. Hasil uji penentuan nilai MIC dan MBC dapat dilihat pada Tabel 5. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah konsentrasi minimum ekstrak bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sedangkan MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*) adalah konsentrasi minimum ekstrak bakteriosin yang dapat membunuh bakteri uji.

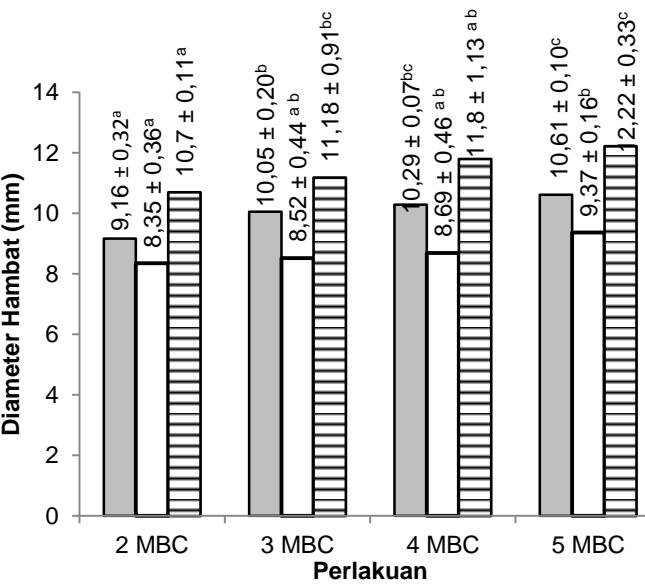
Tabel 5. Hasil Uji Penentuan MIC dan MBC ekstrak bakteriosin

| Bakteri Uji | MIC (%) | MBC (%) |
|-------------------------|---------|---------|
| <i>Pseudomonas sp</i> | 0,55 | 2,22 |
| <i>Proteus morganii</i> | 0,59 | 2,37 |
| <i>Micrococcus sp</i> | 0,36 | 1,45 |

Dari Tabel 5 di atas didapatkan bahwa nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp* adalah 0,55%, sedangkan nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk membunuh bakteri *Pseudomonas sp* adalah 2,22%. Nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Proteus morgani* adalah 0,59%, sedangkan nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk membunuh bakteri *Proteus morgani* adalah 2,37%. Nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Micrococcus sp* adalah 0,36%, sedangkan nilai konsentrasi terkecil ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* untuk membunuh bakteri *Micrococcus sp* adalah 1,45%. Nilai MIC terendah terletak pada bakteri uji *Micrococcus sp*, hal ini menandakan bahwa ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki aktivitas yang tinggi terhadap bakteri Gram Positif. Semakin kecil nilai MIC maka semakin baik kekuatan antibakteri suatu senyawa. Nilai MBC yang didapat akan digunakan sebagai penentuan perlakuan konsentrasi ekstrak bakteriosin pada tahap selanjutnya. Pada penelitian Magdalena (2009) hasil MIC yang didapat menunjukkan bahwa konsentrasi minimum substrat kasar bakteriosin *Lactobacillus fermentum* 2B2 yang dapat mengurangi jumlah bakteri *S.aureus* ATCC 25923 terjadi pada konsentrasi substrat kasar bakteriosin sebesar 70% dengan pengurangan sebesar 1,67 log cfu/ml yang dimulai dari konsentrasi 10%.

5.3.2 Aplikasi Bakteriosin Terhadap Konsentrasi yang Berbeda

Tahap perlakuan konsentrasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji (*Pseudomonas sp*, *Proteus morgani*, *Micrococcus sp*). Hasil aktivitas hambat bakteriosin *Lactobacillus casei* terhadap bakteri uji (*Pseudomonas sp*, *Proteus*



Keterangan:
Perlakuan 2 x MBC berturut-turut (4,4%; 4,7%; 2,7%)
Perlakuan 3 x MBC berturut-turut (6,6%; 7,1%; 4,1%)
Perlakuan 4 x MBC berturut-turut (8,8%; 9,5%; 5,4%)
Perlakuan 5 x MBC berturut-turut (11,1%; 11,8%; 6,8%)
Notasi huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$)
Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($p > 0,05$)

Gambar 15. Grafik aktivitas hambat ekstrak bakteriosin pada konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri pembentuk histamin

Hasil analisis keragaman perbedaan konsentrasi pada Lampiran 7, 8 dan

9 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi bakteriosin berpengaruh nyata terhadap diameter hambat bakteriosin dan interaksi keduanya ($p < 0,05$) sehingga

dilanjutkan dengan uji BNT. Dari uji Beda Nyata Terkecil 5% pada bakteri

Pseudomonas sp terlihat bahwa perlakuan konsentrasi 4,4% (2 x MBC) berbeda

nyata dibandingkan perlakuan konsentrasi lainnya. Perlakuan konsentrasi 6,6%

(3 x MBC) dan perlakuan konsentrasi 8,8% (4 x MBC) berbeda nyata dengan

perlakuan konsentrasi 4,4% (2 x MBC) dan perlakuan konsentrasi 11,1% (5 x

MBC) tetapi tidak berbeda nyata satu sama lain. Pelakuan konsentrasi 11,1%

berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi lainnya. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, maka semakin tinggi pula aktivitas hambat bakteriosin terhadap bakteri *Pseudomonas sp.*

Dari uji Beda Nyata Terkecil 5% pada bakteri *Proteus morganii* terlihat bahwa perlakuan konsentrasi 4,7% ($2 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 11,8% ($5 \times$ MBC) tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 7,1% ($3 \times$ MBC) dan perlakuan konsentrasi 9,5% ($4 \times$ MBC). Perlakuan konsentrasi 7,1% ($3 \times$ MBC) dan perlakuan konsentrasi 9,5% ($4 \times$ MBC) tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi lainnya. Perlakuan konsentrasi 11,8% ($5 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 4,7% ($2 \times$ MBC) tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 7,1% ($3 \times$ MBC) dan perlakuan konsentrasi 9,5% ($4 \times$ MBC).

Dari uji Beda Nyata Terkecil 5% pada *Micrococcus sp* terlihat bahwa perlakuan konsentrasi 2,7% ($2 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 4,1% ($3 \times$ MBC) dan perlakuan konsentrasi 6,8% ($5 \times$ MBC) tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 5,4% ($4 \times$ MBC). Perlakuan konsentrasi 4,1% ($3 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 2,7% ($2 \times$ MBC), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan konsentrasi 5,4% ($4 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 6,8% ($5 \times$ MBC), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan konsentrasi 6,8% ($5 \times$ MBC) berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 2,7% ($2 \times$ MBC) dan perlakuan konsentrasi 5,4% ($4 \times$ MBC), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 4,1% ($3 \times$ MBC).

Aktivitas hambat mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi bakteriosin yang diberikan. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 16 dimana aktivitas hambat tertinggi pada masing – masing bakteri uji terdapat pada perlakuan D yang memiliki konsentrasi paling tinggi dan aktivitas hambat

terendah pada masing – masing bakteri uji terdapat pada perlakuan A yang memiliki konsentrasi paling rendah.

Pada bakteri *Pseudomonas* sp terjadi peningkatan diameter hambat sebesar 9,72% antara perlakuan (2 x MBC) dan (3 x MBC), 2,39% antara perlakuan (3 x MBC) dan (4 x MBC), serta 3,11% antara perlakuan (4 x MBC) dan (5 x MBC). Pada bakteri *Proteus morgani* terjadi peningkatan diameter hambat sebesar 2,03% antara perlakuan (2 x MBC) dan (3 x MBC), 1,99% antara perlakuan (3 x MBC) dan (4 x MBC), serta 7,82% antara perlakuan (4 x MBC) dan (5 x MBC). Pada bakteri *Micrococcus* sp terjadi peningkatan diameter hambat sebesar 4,48% antara perlakuan (2 x MBC) dan (3 x MBC), 5,55% antara perlakuan (3 x MBC) dan (4 x MBC), serta 3,56% antara perlakuan (4 x MBC) dan (5 x MBC). Hal ini dapat dikatakan bahwa setiap peningkatan konsentrasi yang dilakukan, maka terjadi pula peningkatan diameter hambat bakteriosin pada bakteri pembentuk histamin.

Hasil penelitian didapatkan bahwa aktivitas hambat cenderung meningkat berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi dalam perlakuan, walaupun terdapat inkonsistensi aktivitas hambat dari setiap ulangan per perlakuan. Hal ini disebabkan perbedaan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis bakteri uji dan konsentrasi senyawa bakteri yang berbeda juga memberikan aktivitas hambat yang berbeda. Fardiaz (1992) juga menyatakan bahwa zat antimikroba bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang), dan germisidal (menghambat germinasi spora bakteri).

Kemampuan suatu zat antimikroba terhadap penghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain (1) konsentrasi bahan pengawet, (2) suhu lingkungan, (3) waktu penyimpanan dan (4) sifat-sifat mikroba (jenis, umur, dan konsentrasi).

6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* mampu menghambat bakteri *Pseudomonas sp*, *Proteus morganii* dan *Micrococcus sp*.
2. Ekstrak bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki stabilitas suhu yang tinggi dimana pada suhu 95 °C masih memiliki aktivitas hambat terhadap bakteri uji.
3. Bakteriosin *Lactobacillus casei* pada bakteri uji *Pseudomonas sp* mempunyai aktivitas optimum pada pH 5 dengan diameter hambat sebesar 8,25 mm, sedangkan pada bakteri uji *Micrococcus sp* memiliki aktivitas optimum pada pH 4 dengan aktivitas hambat sebesar 9,25 mm. Bakteriosin aktif pada pH asam.
4. Bakteriosin *Lactobacillus casei* memiliki berat molekul 14,34 kDa yang masuk dalam kelompok bakteriosin kelas III, umumnya berukuran besar (>10 kDa), dan tidak tahan panas.
5. Aktivitas hambat cenderung meningkat berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi dalam perlakuan.

6.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk dilakukan optimasi produksi bakteriosin *Lactobacillus casei* dan aplikasinya pada produk perikanan.

6. KESIMPULAN DAN SARAN

DAFTAR PUSTAKA

- Abee, T., Krockel, L., and Hill, C. 1995. Bacteriocins: Modes of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28(2):169-185.
- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 2010. Penanganan Ikan Segar. Widya Padjajaran. Bandung.
- Ahmed Z, Y Wang, Q Cheng, M Imran. 2010. *Lactobacillus Acidophilus* Bacteriocin, From Production To Their Application: An Overview. *African Journal of Biotechnology* 9(20):2843-2850.
- Altena, K., A. Guder, C. Crame, & G. Bierbaum. 2000. Biosynthesis Of Lantibiotic Mersacidin: Organization Og Type B Lantibiotic Gene Cluster. *J. Appl Environ Microbiol.* 66(6): 2565 – 2571.
- Arikunto, S. 2006, Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek. Edisi Revisi VI. Rineka Cpta. Jakarta. Hal. 239-245.
- Avonts, L., Van Uytven, E., & De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal* 14: 947–955.
- Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S, Wright, A. (eds). *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Balia, R.L. 2009. Penggunaan Biopreservatif Mikroorganisme Pada Produk Makanan Asal Ternak Suatu Alternative. <http://www.pdf4free.com>.
- Bhunia,A.K., M.C. Johnson, and B. Ray, 1987, Direct Detection of an Antimicrobial Peptide of *Pediococcus acidilactici* in Sodium Dodecyl sulfate –Polyacrilamide Gel Electrophoresis. *J. Industrial Microbiol* 2(5):319-322.
- Bloomfield, S.F. 1991. Methods For Assessing Antimicrobial Activity. In: Denyer SP, Hugo WB, editors. *Mechanisms Of Action Of Chemical Biocides Their Study And Exploitation*. Blackwell Scientific Publication: London.
- Boe, Joe Young. 1996. Evaluation of Optimum Production for Bacteriocin from *Lactobacillus* sp JB 42 Isolation from Kimchi. *J Microbiol Biotech* 6: 63-67.
- Branen, A. L. & P. M. Davidson. 1993. *Antimicrobial in Food*. 2nd Edition. Marcell Dekker, New York.
- Chotiah, S. 2013. *Eksplorasi dan Konservasi Sumber Daya Genetik Mikrobia Penghasil Bakteriosin Penghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen pada Ternak*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Bogor.

- Repository Universitas Brawijaya
Cleveland, J., T.J. Montville., I.F. Nes and M.L Chikindas. 2001. Bacteriocin: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. International Journal of Food Microbiology. 71(1):1-20.
- Coventry, M. J., Muirhead, K., and Hickey, M. W. 1995. Partial Characterization of Pediocin PO2 and Comparison with Nisin for Biopreservation of Meat Products. Int. J. Food Microbiol. 26(2) : 133-145.
- Cuesta, M.C.M., Kok, J., Herranz, E., Pelaez, C., Requena, T., and Buist, G. 2000. Requirement of Autolytic Activity for Bacteriocins-induced Lysis. Appl Environ Microbiol 66(8):3174-3179.
- De Vuyst, L. and E. J. Vandamme. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional, London.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria In De Vuyst, L and E.J. Vandamme. Bacteriocins of Lactic acid Bacteria : Microbiology, Genetic, and Application. London, Blackie Academic Professional.
- Diswanto, E dan Edwan K. 2015. Isolasi dan Karakterisasi *Pseudomonas* sp Dari Tanah Tercemar Hidrokarbon Minyak Bumi Sematera dan Jawa. Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Djaafar, T.F., Rahayu, E.S., Wibowo, D., Sudarmadi, S. 1995. Substansi Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Growol. Seminar Nasional XII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia, Denpasar 17-18 Nopember 1995. 15 Halaman.
- Drider, D., G. Fimland., Y. Hechard., L.M. McMullen., and H. Prevost. 2006. The Continuing Story of Class II Bacteriocins. J. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(2) : 564-582.
- Ela, M.A., N.S. El-Shaer, and N.B. Ghanem. 1996. Antimicrobial Evaluation and Chromatographic Analysis of Some Essential and Fixed oils. Pharmazie. 51:993-995.
- Fadda, S., Patricia, A., Fabienne B., Monique Z., Regine T., Graciela V., Marie C and Champornier-Verges. 2010. Adaptive response of *Lactobacillus sakei* 23K during growth in the presence of meat extracts: A proteomic approach. International Journal of Food Microbiology 142: 36-43.
- Fardiaz, S., 1987. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas IPB, Bogor.
- Fardiaz, S., 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Fatchiyah, E.L. Arumingtyas, S. Widjarti, dan S. Rahayu. 2006. Analisa Biologi Molekuler: Isolasi DNA, PCR, Immunoblotting, dan Isoenzyme. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 59, 76, 78-80.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2001. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance. Edisi ke-3. Washington DC: US FDA.

- Repository Universitas Brawijaya Fletcher GC, Summers G, Winchester RV, Wong RJ. 1996. Histamine And Histidine In New Zealand Marine Fish And Shellfish Species, Particularly Kahawai (*Arripis Trutta*). *Journal Aquaculture Food Protection Technology* 4(2):53-74.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. <http://www.fao.org/fishery/publication/yearbook/en>
- Galvez, A., H. Abriouel., R.L. Lopez, and N.B. Omar . 2007. Bacteriocin-based Strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2):51-70.
- Gaman P.M, dan Sherrington. 1994. Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Garver, K. L. and P. M. Muriana. 1993. Detection, Identification and Characterization of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria From Retail Food Products. *J. Int. Food Microbiol.* 19(4):241 – 258.
- Goktepe I, Vijay KJ dan Mohamed Ahmedna. 2006. Probiotics in Food Safety and Human Health. New York (US): Taylor & Francis Group.
- Gonowiak, Z., Gajewska R., Lipka E. 1990. *Pantstw Zokl Hiq.* 41(1-2) 50-57.
- Gonzales, B. E., F. Glaasker, F. R. S. Kunji, A. J. M. Driessens, J. E. Suarez, and W. N. Konings. 1996. Bactericidal Mode of Action of *Plantaricin S*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 62:2701-2709.
- Hadioetomo. 1990. Mikrobiologi Dasar Jilid I. Jakarta: Erlangga.
- Hadiwyoto, S. 1994. Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Liberty. Yogyakarta.
- Harmayani, E., Ngatirah, Endang S.R. Tyas U.2001. Ketahanan dan Viabilitas Probiotik Bakteri Asam Laktat Selama Proses Pembuatan Kultur Kering Dengan Metode Freeze dan Spray Drying. *Jurnal Teknol. Dan Industri Pangan Vol XII No. 2.*
- Helander, I. M., A. von Wright and T. M. Mattila-Sandholm. 1997. Potential Of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobial Against Gram Negative Bacteria. *Trends in Food Sci. and Technol.* Vol. 8(5):146-150.
- Heng, N.C., Ragland, N.L., Swe, P.M., Baird, H.J., Inqlis, M.A., Tagg, J.R., and Jack, R.W. 2006. Dysgalacticin: a Novel, Plasmid-encoded Antimicrobial Protein (bacteriocin) Produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology* 152:1991-2001.
- Heruwati, E.S., Romauli A.S., dan Wibowom. 2008. Penghambatan Enzim *L-histidine decarboxylase* dari Bakteri Pembentuk Histamin Menggunakan Asam Benzoat. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol. 3 No. 2.*

- Repository Universitas Brawijaya
Hoffmann, A., Schneider, T., Pag, U., and Georg, H. 2004. Localization and Functional Analysis of Pepl, the Immunity Peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3263-3271.
- Holzapfel, W.H., Geizen, R., and Schillinger, U. 1995. Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food Grade Enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24(3):343-362.
- Hurst, A. 1983. Nisin and other Inhibitory Substances from Lactic Acid Bacteria. Di dalam : A.L. Branen dan P.M Davidson (Eds.). *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Indriati, N., Rispayeni, dan Heruwati, E.S. 2006. Studi Bakteri Pembentuk Histamin Pada Ikan Kembung Peda Selama Proses Pengolahan. *J. Penel. Perik.Indonesia*. 1(2): 117–123.
- Irawan, N dan S.P. Astuti. 2006. Mengolah Data Statistik dengan Mudah Menggunakan Minitab 14. Andi offset. Yogyakarta.
- Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocin of Gram Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. 59(2):171-200.
- Jack, R.W., Wan, J., Gordon, Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J. 1996. Charaterization Of The Chemical And Antimicrobial Properties Of Pisicolin 126, A Bacteriocin Produced By *Carnobacterium piscicola* Jg 126. *Appl. Environ. Microbiol*, 62(8):2897-2903.
- Jay, W.C. 1996. *Modern Food Microbiology*. 4th..ed. International Thompson Publishing. 661 pp.
- Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th Edition. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Jeevaratnam, K. M. Jamuna, & A.S. Bawa. 2005. Biological Preservation bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. *J. Indian Journal of Biotechnology*. 4: 446- 454.
- Jiménez-Díaz R., R.M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J.L Ruiz-Barba and J. C. Piard. 1993. Plantaricin S and T; Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from A Green Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(5):1416–1424.
- Joe, Y.B., B. Kwung Ni, K. Sung Koo, & J. Hong Ki. 1996. Evaluation of Optimum Production for Bacteriocin from *Lactobacillus* sp. JB 42 Isolation from Kimchi. *J. Microbiol. Biotech.* 6: 63-67.
- Joerger, M.C and T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization And Purification Of Helveticin J And Evidence For A Cromosomally Determinined Bacteriocin Produced By *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacterial.* 167(2):439-446.

- Repository Universitas Brawijaya
Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E.G.Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi. Rajawali Pers. Jakarta.
- Kato T., T. Matsuda., E. Ogawa., H. Ogawa., H. Kato., U. Do.i, and R. Nakamura. 1994. Plantaricin-149, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149, J. Ferment. Bioeng . 77(3): 277–282.
- Khalid, F., R. Siddiqi and N. Mojgani.1999. Detection and Characterization of a Heatstable Bacteriocin. Med. J. Islam. Acad. Sci. 12(3):67-71.
- Klaenhammer, T.R., C. Ahn, C. Fremaux, and K. Milton. 1990. Molecular Properties of *Lactobacillus* Bacteriocin. In: R. James, C. Lazdunski, and F. Pattus (Editors). Bacteriocins, Microcins, and Lantibiotics. Springer-Verlag, Berlin.
- Kim, SH, An H, Price RJ.1999. Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested off the u.s. Northwest coast. Journal of food Science Vol 64 No. 2 Hal :340-343.
- Kumari, A., Nefise, A and Mustafa A. 2012. Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL171. World J.Microbiol Biotechnol 28:1647-1655.
- Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. Journal of Applied Bacteriology 75: 113-22.
- Lee, H and Kim, H.Y. 2011. Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. J. Microbiol Biotechnol. 21(3):229-235.
- Leroy, LDVF. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. J Mol Microbiol Biotechnol. 13(4):194–199.
- Liiasi, S.A., Azmi, T.I., Hassan, M.D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M. And Ariff, A.B. 2009. Antimicrobial Activity and Antibiotic Sensitivity of Three isolates of Lactic Acid Bacteria from Fermented Fish product, Budu. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 5(1) 2009. Pp. 33-37.
- Lindgren, S.E., dan Dobrogosz W.J. 1990. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations. FEMS Microb. Rev. 87: 149– 64.
- Lopez-Sabater El, Rodriguez-Jerez JJ, Hernandez-Herrero M, Mora-Ventura MT. 1996. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). Journal of Food Protection 59(2):167-174.
- Lund, B.M., T.C. Baird-parker, dan G.W. Gould. 2000. The Microbiological Safety and Quality of Food.Vol.I. Aspen Publisher, Inc, Maryland.

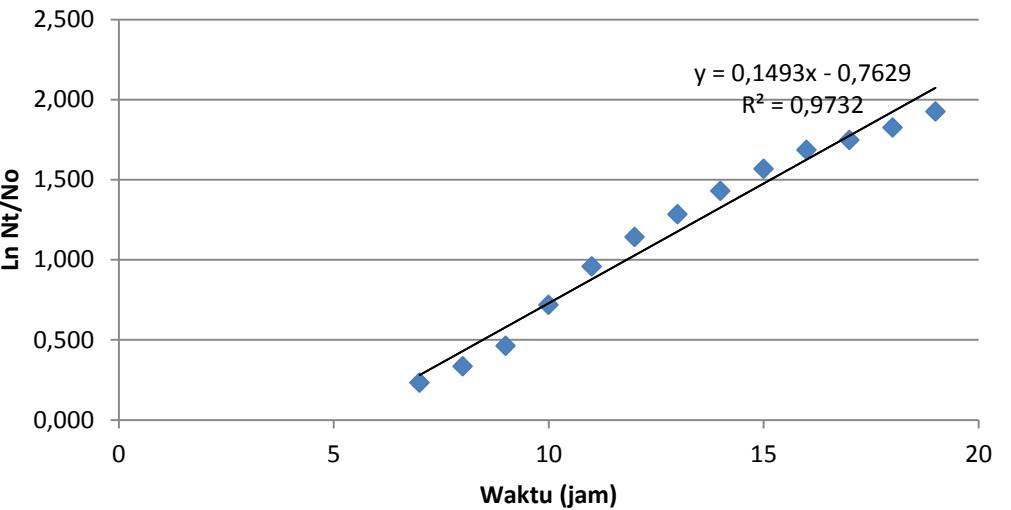
- Repository Universitas Brawijaya
Mangunwardoyo, W., Romauli A, S. dan Endang S.H. 2007. Seleksi dan Pengujian Aktivitas Enzim *l-histidine decarboxylase* dari Bakteri Pembentuk Histamin. Makara, Sains, vol. 11, no. 2, November 2007: 104-109.
- Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Mathot, A.G., Beliard, E., and Thuault, D. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 Produces a Bacteriocin Potentially Suitable for Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Hard Cheese. J. Diary Sci 86(10):3068-3074.
- Martin RE, Flick GJ, Hebard CE, Ward DR. 1982. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products. United States : AVI publishing company, Inc.
- Marugg, J.D. 1991. Bacteriocins. Their Role in Developing Natural Products. Food Biotechnology, 5 (3): 305-312.
- Mehta, A.M., Patel, K.A., Davee, P.J. 1983. Purification and Properties of The Inhibitory Protein Isolated from *L.acidophilus* ACI. Microbiology. 38:73.
- Meira, M.M., Morency, H., and Lavoie, M.C. 2005. In vivo Activity of Mutacin B-Ny266. J. Antimicrob Chemother 56:869-871.
- Meryandini, A. 2009. Isolasi Bakteri dan Karakterisasi Enzimnya. Makara Sains 2009;13 : 33-38.
- Microbiologi Glossary. 2013. *Lactobacillus casei*. <http://microbiologyglossary.wikispaces.com>. Diakses pada tanggal 16 Oktober 2013.
- Middlebeek, E.J., R.O. Jenkins and J.S. Drijver-de Haas. 1992. Growth in batch culture. In Vitro Cultivation of Micro-organisms. Biotechnology by Open Learning.
- Nahla, Korashy, T. and Farag, H.S.M. 2005. Histamine And Histamine Producing Bacteria In Some Local And Imported Fish And Their Public Health Significance. Res J. Agr. & Bio. Sci. 1(4): 329–336.
- Nazir, M., 2009. Metode Penelitian. Cetakan ke tujuh, Penerbit Ghalia Indonesia. Hal. 54, 63, 122, 221.
- Nes I.F., and Holo, H. 2000. Class II Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria. Biopolymers 55: 62-73.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo., L. S. Havarstein., K. Sletten, dan I.F. Nes. 1992. A Novel Lactococcal Bacteriocin whose Activity depends on the Complementary Action of Two Peptides. J. Bacterial. 174(17): 5686-5692.
- Niven, C.F., Jeffrrey, M.B., and Corlett, D.A. 1981. Differential Plating Medium For Quantitative Detection Of Histamine Producing Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. p. 321–322.

- Repository Universitas Brawijaya
Nugroho, D.A dan Endang, S.R. 2003. Ekstraksi dan Karakterisasi Bakteriosin yang Dihasilkan Oleh *Leuconostoc mesenteroides* SM 22. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XIV. No.3
- Nurhajati, J, Atira, Aryantha INP, Kadek IDG. 2012. The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalmus* Sauvage). IFRJ. 19(4):1723–7.
- Nurhasanah. 2004. Produksi Bakteriosin pada Berbagai Tingkat Aerasi dan Uji Kestabilan Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur M6-15. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Nurlia. 1997. Pengaruh Penambahan Bakteriosin Dan Gabungan Bakteriosin Produksi Bakteri Asam Laktat Terhadap Jumlah Bakteri Dalam Susu Pasteurisasi. Tesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nurliana. 2009. Prospek Makanan Tradisional Aceh sebagai Makanan Kesehatan Eksplorasi Senyawa Antimikroba dari Minyak Pliek u dan Pliek u. Forum Pascasarjana. 32(1):1-10.
- Nurwantoro dan Djarijah. 1997. Mikrobiologi Pangan Hewani-Nabati. Kanisius. Yogyakarta.
- Ogunbanwo, S.T., A.L. Sanni, and A.A. Onilude. 2003. Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African J.Biotechnol. Vol. 2 (8), p. 219-227.
- Ohmomo, S., S. Murata., N. Katayama., S. Nitisinprasart., M. Kobayashi., T. Nakajima., M. Yajima and K. Nakanishi. 2000. Purification And Some Characteristics Of Enterocin On-157, A Bacteriocin Produced By *Enterococcus faecium* Niai 157. Journal of Applied Microbiology 2000, 88, 81-89.
- Omura Y, Price RJ, Olcott HS. 1978. Histamine Forming Bacteria Isolated From Spoiled Skipjack Tuna And Mackerel. *Journal of Food Science* 43(6):1779-1781.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi 2. Terjemahan R. S. Hadioetomo, T. Imas, S. S. Tjitrosomo, dan S. L. Langka. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pramono, B.Y., E. Harmayani, dan T.Utami. 2003. Kinetika Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus* sp Pada Media MRS Cair. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XIV. No.1.
- Price RJ, Melvin EF, Bell JW. 1991. Postmortem changes in chilled round bled and dressed albacore. Jurnal of Food Science 56(2):318-321.
- Purves, D., David, FS, Mark W, James OM, George JA, Lawrence CK, Anthony SL. 2001. *Neuro Science*, 2nd ed. Sinauer Associates. <http://www.ncbi.nlm.gov/books/bv.fegi?call=bv.View..ShowTOC&ris=neur osc:TOC&depth=10>

- Repository Universitas Brawijaya
Putro, S. 2002. Handling and Processing of Tuna for Sashimi and resh Chilled Product 3rd reprint. Infofish Technical Handbook Series.
- Ray, B. 1992. Cells of Lactic Acid Bacteria as Food Biopreservatives. In Ray, B dan Daeschel, M.A. (Ed.) : Food Biopreservatives of Microbiology Origin. CRC Press. New York.
- Ray, B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC Press. Tokyo.
- Ray, B. & A. Bhunia. 2007. Fundamental Food Microbiology. 4th Edition. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Ray B, Bhunia A. 2008. Fundamental Food Microbiology. Ed ke-4. London: CRCPr.
- Reenen, V.A.C, W.H. Van Zyl, & L.M.T Dicks. 2006. Expression of the Immunity Protein of plantaricin 423, Produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and Analysis of the Plasmid Enconding the Bacteriocin. *J. Appl and Environ. Microbiol.* 72(12), 7644-7651.
- Respayeni. 2005. Bakteri Pembentuk Histamin pada Peda Kembung Perempuan (Rastrelligerneglectus) Selama Proses Pengolahan. Skripsi Sarjana Sains. Fakultas Biologi, Universitas Nasional, Jakarta. 55 pp.
- Rinto. 2010. Perubahan kandungan mikroflora akibat penambahan starter *Pediococcus acidilactici* F-11 dan garam selama fermentasi peda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 13(1): 35-47.
- Sa'id, E.G. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi. PT. Melton Putra. Jakarta.
- Sally, H.A., Price, R.S., and Brown, W. 1980. Histamine Formation By Bacteria Isolated From Skipjack Tuna. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 46(8): 991-995.
- Salminen, S. Dan A.V. Wright. 1993. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker Inc.
- Saranya S, Hemashenpagam N. 2011. Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria from fermented dairy products. *Advances in Applied Science Research* 2(4): 528-534.
- Savadogo, A., A. T. Q. Cheik, H. N. B. Imael and S. A. Traore. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afric. J. Biotechnol.* 5 (9): 678-683.
- Schannel N., Entian, K.D., Schneider, U., Gots F., Zahner H., Kellner R.,Jung G. 1998. Prepeptida Sequence of Epidermin, a Ribosomally Synthesized Antibiotic With Four Sulphide-Ring. *Nature London.* 333:276-278.
- Sophia, R.A. 2007. Seleksi dan Pengujian AktivitasEnzim L-Histidine Decarboxylase dari Bakteri Pembentuk Histamin. Tesis. Fakultas MIPA, Universitas Indonesia. 71 pp.

- Repository Universitas Brawijaya
Sriwira, M dan Intarapichet, K. 2005. Selection of Lactic Acid Bacteria for Bacteriocin Production and Application for Extending Shelf-life of Chicken Meatballs. Thesis School of Food Technology. Suranaree University of Technology. Thailand.
- Sterrit, R.M., J.N. Lester. 1988. Microbiology for Environmental and Public Health Engineers. London: E&FN Spon Ltd.
- Sumarsih, S., 2003. Mikrobiologi Dasar. Universitas Pembangunan Nasional Veteran, Yogyakarta.
- Suprihanto, AJ. 2009. Pengaruh Jenis Bakteri Asam Laktat Terhadap Kualitas Dadih Sapi Probiotik Selama Penyimpanan dalam Suhu Ruang dan Suhu Rendah. Skripsi Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fateta, IPB, Bogor.
- Suriasih, K. 2014. Karakteristik Senyawa Antimikroba Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat Isolat Kefir Dan 'Biji' Kefir. Fakultas Peternakan Unud dan IGN Agung Fakultas Teknologi Pertanian Unud.
- Suseno, T.I., Sutarjo, S., dan Anita, K., 2000. Minuman Probiotik Nira Siwalan : Kajian Lama Penyimpanan Terhadap Daya Anti Mikroba Lactobacillus casei pada Beberapa Bakteri Patogen. Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi Volume 1 Nomor 1, April.
- Tabrani. 1997. Teknologi Hasil Perairan. Universitas Islam Riau Press. Riau.
- Tagg, J.R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram positif bacteria. *J. Bacteriol. Rev.* 40 (3): 722-756.
- Teo, A.Y.L. and Tan, H.M. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. *Appl Environ Microbiol* 71(8):4185-4190.
- Upreti, GC and Hindsill, R.D. 1975. Production and Mode of Action of Lactocin 27 : Bacteriocin from a Homofermentative Lactobacillus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975 Feb; 7(2): 139–145.
- Usmiati, S. dan Marwati, T. 2007. Seleksi dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. *J.pascapanen* 4(1):27-37.
- Usmiati, S., Miskiyah dan Rarah R.A.M. 2009. Pengaruh Penggunaan Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp Galur SCG 1223 Terhadap Kualitas Mikrobiologi Daging Sapi Segar. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Usmiati, I dan Nur, R. 2011. Potensi Bakteriosin Dari *Lactobacillus* sp Galur SCG 1223 Sebagai Biopreservatif Pada Daging Segar. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian* Vol. 7(2).
- Wendakoon, C.N., and M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *J.Food Prot.* 58(3): 280–283.

- Repository Universitas Brawijaya
Wisti, A., Yusmarini, dan Rahmayuni. 2014. Aktivitas antimikroba *Lactobacillus plantarum* 1 yang diisolasi dari susu kedelai terfermentasi spontan. JOM paperta Vol.1 No. 2.
- Van West P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an Oomycete Pathogen with a Fishy Appetite : New Challenges for an Old Problem. *Mycologist* 20(3): 99 – 104.
- Venema, K., T. Abe, A.J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, J. Kok, W.N. Konings dan G. Venema. 1994. Mode of Action of lactococcins Bacteria, a thiol Activated Bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 (4), 1041-1048.
- Wahyudi, A dan S. Samsundari. 2008. Bugar dengan Susu Fermentasi. UMM Press. Malang. Hlm : 108-147.
- Widodo, A.D. 2003. Bioteknologi Industri Susu. Cetakan Pertama. Lacticia Press. Yogyakarta.
- Wilson K. 1994. Protein and enzyme techniques In Practical Biochemistry, (ed. Wilson K and Walker JM), Cambridge University Press. p.161-226.
- Yudhabuntara, D. 2003. Pengendalian Mikroorganisme Dalam Bahan Makanan Asal Hewan. Pelatihan Pengawas Kesmavet. Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan Departemen Pertanian.

Lampiran 1. Perhitungan karakter pertumbuhan bakteri**Karakter Pertumbuhan****Nilai:**

Kecepatan pertumbuhan maksimal (per jam)

0,1493

Lag time (jam)

5,1098

Nilai maksimal jumlah sel (Å)

2,002

Waktu generasi (jam)

13,4098

Konstanta laju pertumbuhan spesifik

0,0517

Keterangan :

Kecepatan pertumbuhan maksimal = persamaan nilai a

= persamaan nilai b / kecepatan

pertumbuhan maksimal

= $0,7629 / 0,1493$

= 5,1098

= nilai maksimal jumlah sel / kecepatan pertumbuhan maksimal

= $2,002 / 0,1493$

= 13,4098

- Waktu generasi

- Konstanta laju pertumbuhan spesifik = $\ln(2) / \text{waktu generasi}$

= $\ln(2) / 13,4098$

= 0,0517

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 2. Data ANOVA dan uji BNT aktivitas hambat ekstrak bakteriosin

| Bakteri | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|--------------------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| <i>Pseudomonas sp</i> | 8,05 | 8,35 | 8,45 | 24,85 | 8,28 | 0,21 |
| <i>Proteus morgani</i> | 7,82 | 8,05 | 8,43 | 24,30 | 8,10 | 0,31 |
| <i>Micrococcus sp</i> | 10,20 | 10,05 | 10,35 | 30,60 | 10,20 | 0,15 |
| <i>Staphylococcus sp</i> | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Tests of Normality^b

| Bakteri | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|-----------|-------------|------------------|-----------|-------------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter 1 | .292 | 3 | . | .923 | 3 | .463 |
| 2 | .231 | 3 | . | .980 | 3 | .731 |
| 3 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |

a. Lilliefors Significance Correction

b. Diameter is constant when Bakteri = 4. It has been omitted.

ANOVA

| Diameter | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-----------------------|-----------|--------------------|----------|-------------|
| Between Groups | 184.786 | 3 | 61.595 | 1.5333 | .000 |
| Within Groups | .321 | 8 | .040 | | |
| Total | 185.107 | 11 | | | |

Diameter

| Bakteri | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|--------------------------|----------|-------------------------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tukey HSD ^a 4 | 3 | .0000 | | |
| 2 | 3 | | 8.1000 | |
| 1 | 3 | | | 8.2833 |
| 3 | 3 | | | 10.2000 |
| Sig. | | 1.000 | .688 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 3. Data ANOVA dan uji BNT karakterisasi suhu dan waktu pemanasan

| Bakteri | Suhu (°C) | Waktu (menit) | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|-----------------------|--------------|------------------|-------------------------|------|------|---------------|-------------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| Pseudomonas sp | 45 | 15 | 8,28 | 8,30 | 8,32 | 24,90 | 8,30 | 0,02 |
| | | 30 | 8,20 | 8,15 | 8,25 | 24,60 | 8,20 | 0,05 |
| | | 45 | 7,25 | 7,23 | 7,21 | 21,69 | 7,23 | 0,02 |
| | 70 | 15 | 8,10 | 8,30 | 8,20 | 24,60 | 8,20 | 0,10 |
| | | 30 | 7,28 | 7,40 | 7,52 | 22,20 | 7,40 | 0,12 |
| | | 45 | 7,25 | 7,12 | 7,38 | 21,75 | 7,25 | 0,13 |
| | 95 | 15 | 7,15 | 7,05 | 7,10 | 21,30 | 7,10 | 0,05 |
| | | 30 | 6,63 | 6,95 | 6,97 | 20,55 | 6,85 | 0,19 |
| | | 45 | 6,44 | 6,50 | 6,68 | 19,62 | 6,54 | 0,12 |
| Micrococcus sp | 45 | 15 | 9,36 | 9,02 | 9,37 | 27,75 | 9,25 | 0,20 |
| | | 30 | 8,32 | 8,65 | 8,68 | 25,65 | 8,55 | 0,20 |
| | | 45 | 7,55 | 7,59 | 7,21 | 22,35 | 7,45 | 0,21 |
| | 70 | 15 | 7,25 | 7,35 | 7,15 | 21,75 | 7,25 | 0,10 |
| | | 30 | 7,22 | 7,31 | 7,37 | 21,90 | 7,30 | 0,08 |
| | | 45 | 7,15 | 7,22 | 7,23 | 21,60 | 7,20 | 0,04 |
| | 95 | 15 | 7,09 | 7,16 | 7,17 | 21,42 | 7,14 | 0,04 |
| | | 30 | 7,05 | 7,02 | 7,08 | 21,15 | 7,05 | 0,03 |
| | | 45 | 6,85 | 6,50 | 6,90 | 20,25 | 6,75 | 0,22 |

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|-----------|----|-------|--------------|----|------|
| | Suhu | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter | 45 | .159 | 18 | .200* | .917 | 18 | .115 |
| | 70 | .314 | 18 | .000 | .715 | 18 | .000 |
| | 95 | .184 | 18 | .111 | .861 | 18 | .013 |

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|-----------|----|------|--------------|----|------|
| | Waktu | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter | 15 | .240 | 18 | .007 | .838 | 18 | .005 |
| | 30 | .209 | 18 | .037 | .894 | 18 | .045 |
| | 45 | .224 | 18 | .018 | .897 | 18 | .051 |

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Diameter

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|--------|------|
| Corrected Model | 23.050 ^a | 10 | 2.305 | 31.950 | .000 |
| Intercept | 555.771 | 1 | 555.771 | 7.7033 | .000 |
| Waktu | 5.433 | 2 | 2.717 | 37.653 | .000 |
| Suhu | 13.026 | 2 | 6.513 | 90.276 | .000 |
| Bakteri | .589 | 2 | .295 | 4.084 | .024 |
| Waktu * Suhu | 1.999 | 4 | .500 | 6.925 | .000 |
| Error | 3.102 | 43 | .072 | | |
| Total | 3064.103 | 54 | | | |
| Corrected Total | 26.153 | 53 | | | |

Lampiran 4. Data ANOVA dan uji BNT karakterisasi pH

| Bakteri | pH | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|-----------------------|-----------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| Pseudomonas sp | 2 | 7,12 | 7,20 | 7,13 | 21,45 | 7,15 | 0,04 |
| | 3 | 7,20 | 7,23 | 7,32 | 21,75 | 7,25 | 0,06 |
| | 4 | 8,14 | 8,21 | 8,10 | 24,45 | 8,15 | 0,06 |
| | 5 | 8,30 | 8,20 | 8,25 | 24,75 | 8,25 | 0,05 |
| | 6 | 7,40 | 7,50 | 7,30 | 22,20 | 7,40 | 0,10 |
| | 7 | 7,55 | 7,45 | 7,50 | 22,50 | 7,50 | 0,05 |
| | 8 | 7,15 | 7,10 | 7,20 | 21,45 | 7,15 | 0,05 |
| | 9 | 6,65 | 6,81 | 6,88 | 20,34 | 6,78 | 0,12 |
| | | | | | | | |
| Micrococcus sp | 2 | 8,25 | 8,15 | 8,20 | 24,60 | 8,20 | 0,05 |
| | 3 | 9,02 | 9,15 | 9,13 | 27,30 | 9,10 | 0,07 |
| | 4 | 9,15 | 9,28 | 9,32 | 27,75 | 9,25 | 0,09 |
| | 5 | 7,80 | 8,20 | 8,15 | 24,15 | 8,05 | 0,22 |
| | 6 | 8,21 | 8,45 | 8,39 | 25,05 | 8,35 | 0,12 |
| | 7 | 7,75 | 7,92 | 7,97 | 23,64 | 7,88 | 0,12 |
| | 8 | 7,25 | 7,56 | 7,57 | 22,38 | 7,46 | 0,18 |
| | 9 | 6,50 | 6,70 | 6,75 | 19,95 | 6,65 | 0,13 |
| | | | | | | | |

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|-----------|----|-------|--------------|----|------|
| | pH | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter | 2 | .295 | 6 | .112 | .742 | 6 | .017 |
| | 3 | .300 | 6 | .097 | .728 | 6 | .012 |
| | 4 | .291 | 6 | .124 | .768 | 6 | .029 |
| | 5 | .333 | 6 | .036 | .764 | 6 | .027 |
| | 6 | .260 | 6 | .200* | .830 | 6 | .108 |
| | 7 | .235 | 6 | .200* | .890 | 6 | .316 |
| | 8 | .271 | 6 | .191 | .826 | 6 | .099 |
| | 9 | .146 | 6 | .200* | .978 | 6 | .943 |

a. Lilliefors Significance Correction

*: This is a lower bound of the true significance.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Reposit

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Diameter

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|--------|------|
| Corrected Model | 15.801 ^a | 9 | 1.756 | 6.587 | .000 |
| Intercept | 542.441 | 1 | 542.441 | 2.0353 | .000 |
| Bakteri | .639 | 2 | .319 | 1.198 | .313 |
| pH | 15.142 | 7 | 2.163 | 8.115 | .000 |
| Bakteri * pH | .000 | 0 | . | . | . |
| Error | 10.129 | 38 | .267 | . | . |
| Total | 2935.496 | 48 | . | . | . |
| Corrected Total | 25.930 | 47 | . | . | . |

a. R Squared = ,609 (Adjusted R Squared = ,517)

Diameter

| pH | N | Subset | | |
|------------------------|---|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tukey HSD ^a | 9 | 6 | 6.7150 | |
| | 8 | 6 | 7.3050 | 7.3050 |
| | 2 | 6 | | 7.6750 |
| | 7 | 6 | | 7.6900 |
| | 6 | 6 | | 7.8750 |
| | 5 | 6 | | 8.1500 |
| | 3 | 6 | | 8.1750 |
| | 4 | 6 | | 8.7000 |
| Sig. | | | .508 | .097 |
| | | | | .134 |

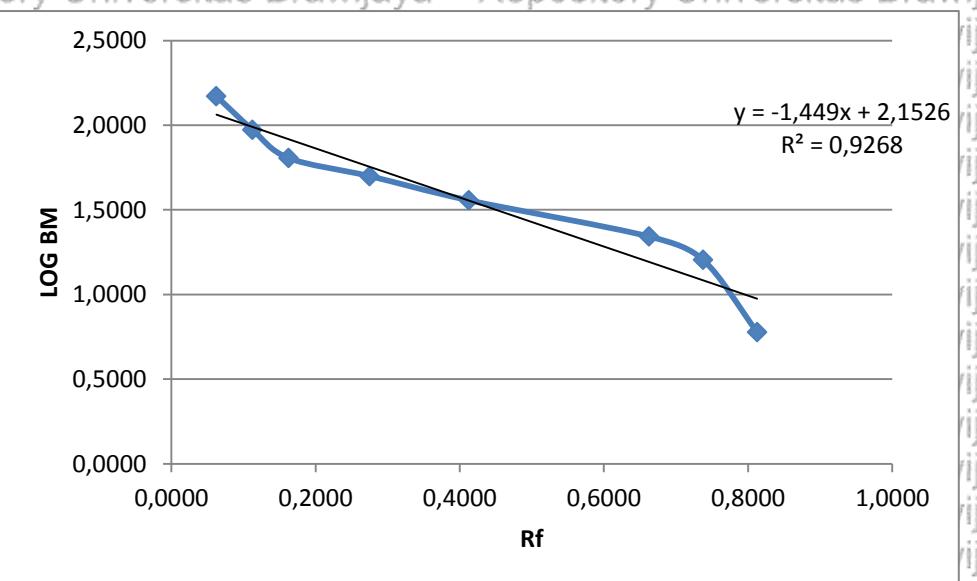
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

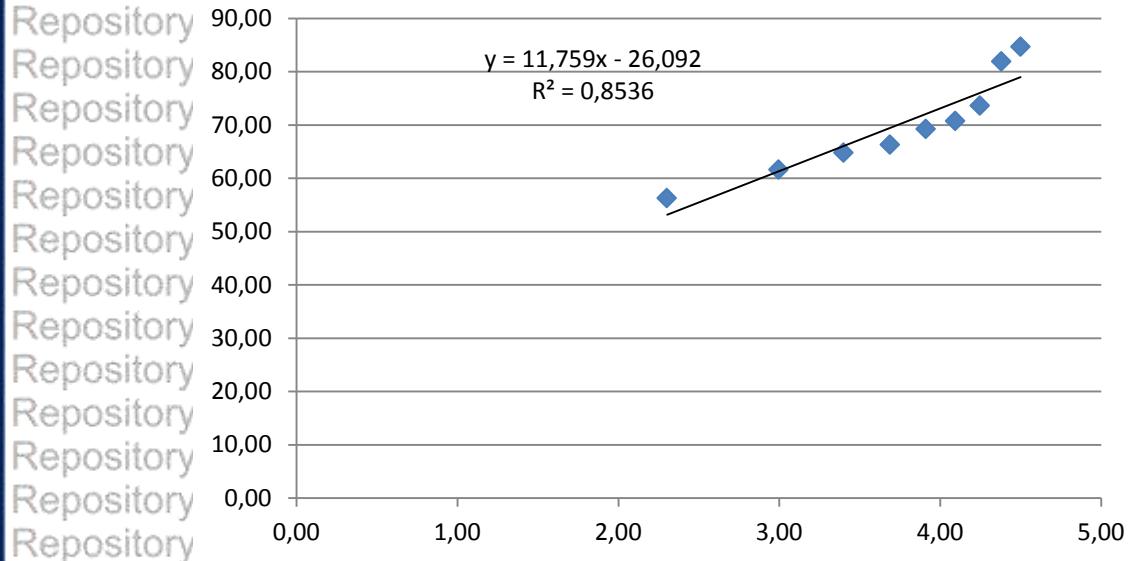
The error term is Mean Square(Error) = ,267.

Lampiran 5. Perhitungan berat molekul bakteriosin**Marker****Pita ke-**

| | (a) | (b) | Rf | BM | Log BM |
|---|------------|------------|-----------|-----------|---------------|
| 1 | 0,5 | 8 | 0,0625 | 148 | 2,1703 |
| 2 | 0,9 | 8 | 0,1125 | 94 | 1,9731 |
| 3 | 1,3 | 8 | 0,1625 | 64 | 1,8062 |
| 4 | 2,2 | 8 | 0,2750 | 50 | 1,6990 |
| 5 | 3,3 | 8 | 0,4125 | 36 | 1,5563 |
| 6 | 5,3 | 8 | 0,6625 | 22 | 1,3424 |
| 7 | 5,9 | 8 | 0,7375 | 16 | 1,2041 |
| 8 | 6,5 | 8 | 0,8125 | 6 | 0,7782 |

**Sampel****Pita ke-**

| | (a) | (b) | Rf | y | BM |
|---|------------|------------|-----------|----------|-----------|
| 1 | 5,5 | 8 | 0,6875 | 1,1564 | 14,34 |

Lampiran 6. Grafik penentuan nilai MIC dan MBC1. Grafik Penentuan Nilai MIC dan MBC ekstrak bakteriosin pada *Pseudomonas**sp*

Persamaan :

$$Y = 11,759x - 26,092$$

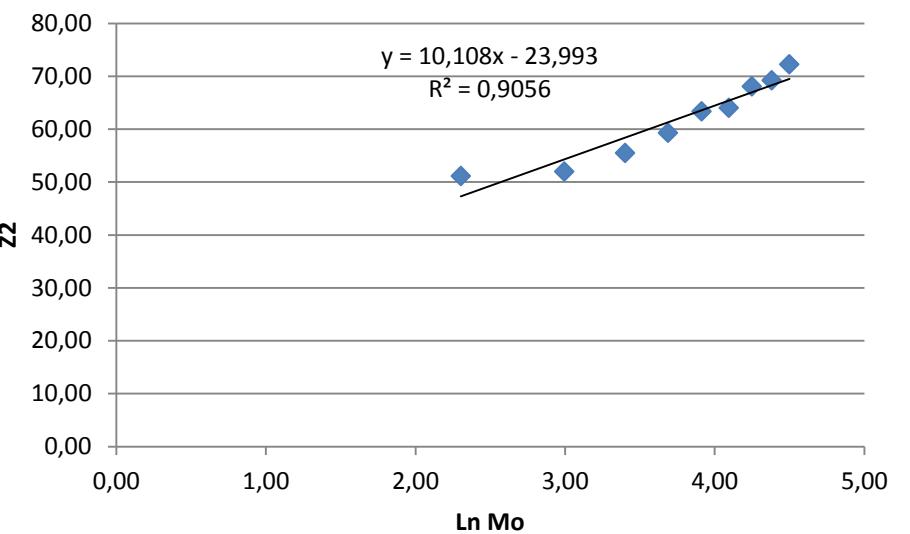
$$0 = 11,759x - 26,092$$

$$Mt(x) = 2,22$$

$$MIC = 0,25(Mt) = 0,55$$

$$MBC = 4(MIC) = 2,22$$

2. Grafik Penentuan Nilai MIC dan MBC ekstrak bakteriosin pada *Proteus* *morganii*



$$Y_1 = 10,108x - 23,990$$

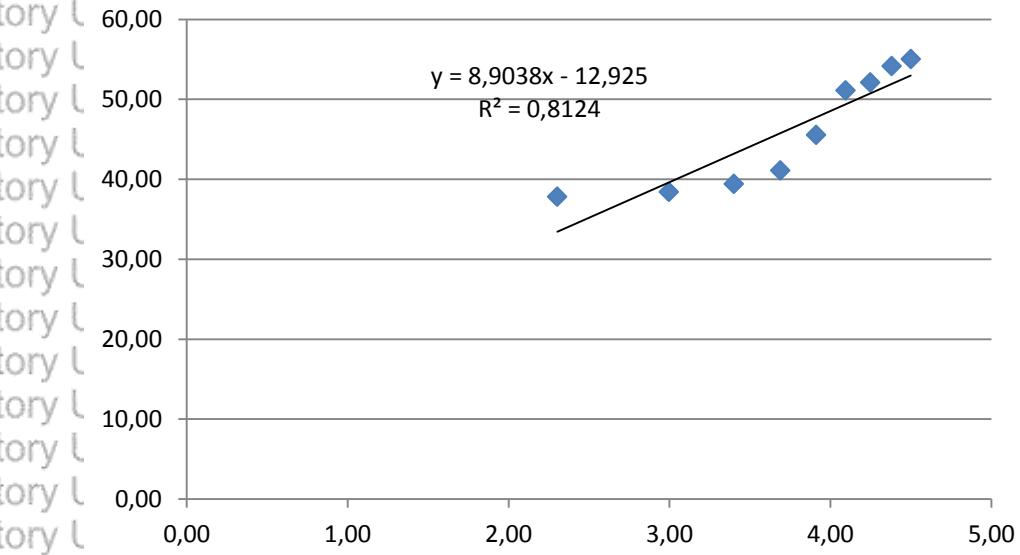
$$0 = 10,108x - 23,990$$

$$Mt(x) = 2,37$$

$$MIC = 0,25 \quad Mt = 0,59$$

$$MBC = 4 \quad MIC = 2,37$$

3. Grafik Penentuan Nilai MIC dan MBC ekstrak bakteriosin pada *Micrococcus* sp



$$Y_1 = 8,9038x - 12,925$$

$$0 = 8,9038x - 12,925$$

$$Mt(x) = 1,45$$

$$MIC = 0,25 \quad Mt = 0,36$$

$$MBC = 4 \quad (MIC) = 1,45$$

Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 7. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap *Pseudomonas sp*
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

| Konsentrasi (%) | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|------------------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| A(4,4%) | 9,45 | 8,82 | 9,20 | 27,47 | 9,16 | 0,32 |
| B(6,6%) | 9,85 | 10,05 | 10,24 | 30,14 | 10,05 | 0,20 |
| C(8,8%) | 10,30 | 10,35 | 10,21 | 30,86 | 10,29 | 0,07 |
| D(11,1%) | 10,50 | 10,62 | 10,70 | 31,82 | 10,61 | 0,10 |

Tests of Normality

| Konsentrasi | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter 4.4 | .221 | 3 | . | .986 | 3 | .774 |
| 6.6 | .177 | 3 | . | 1.000 | 3 | .972 |
| 8.8 | .241 | 3 | . | .974 | 3 | .688 |
| 11.1 | .219 | 3 | . | .987 | 3 | .780 |

a. Lilliefors Significance Correction

ANOVA

| Diameter | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 3.484 | 3 | 1.161 | 30.196 | .000 |
| Within Groups | .308 | 8 | .038 | | |
| Total | 3.791 | 11 | | | |

Diameter

| Konsentrasi | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|----------------------------|---|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Tukey HSD ^a 4.4 | 3 | 9.1567 | | |
| 6.6 | 3 | | 10.0467 | |
| 8.8 | 3 | | | 10.2867 |
| 11.1 | 3 | | | 10.6067 |
| Sig. | | 1.000 | .481 | .265 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 8. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap *Proteus morganii*

| Konsentrasi (%) | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|------------------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| A(4,7%) | 8,25 | 8,75 | 8,05 | 25,05 | 8,35 | 0,36 |
| B(7,1%) | 8,85 | 8,70 | 8,02 | 25,57 | 8,52 | 0,44 |
| C(9,5%) | 8,35 | 8,50 | 9,21 | 26,06 | 8,69 | 0,46 |
| D(11,8%) | 9,25 | 9,32 | 9,55 | 28,12 | 9,37 | 0,16 |

Tests of Normality

| | Konsentrasi | Kolmogorov-Smirnov^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|---------------------------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------|-------------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Diameter | 4.7 | .276 | 3 | . | .942 | 3 | .537 |
| | 7.1 | .322 | 3 | . | .880 | 3 | .325 |
| | 9.5 | .324 | 3 | . | .876 | 3 | .313 |
| | 11.8 | .300 | 3 | . | .913 | 3 | .430 |

a. Lilliefors Significance Correction

ANOVA

| | Diameter | Sum of Squares | | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|-----------------|-----------------------|----|--------------------|----------|-------------|
| | | df | | | | |
| Between Groups | | 1.808 | 3 | .603 | 4.296 | .044 |
| Within Groups | | 1.123 | 8 | .140 | | |
| Total | | 2.931 | 11 | | | |

Diameter

| | Konsentrasi | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------------------------|--------------------|----------|--------------------------------|----------|
| | | | 1 | 2 |
| Tukey HSD ^a | 4.7 | 3 | 8.3500 | |
| | 7.1 | 3 | 8.5233 | 8.5233 |
| | 9.5 | 3 | 8.6867 | 8.6867 |
| | 11.8 | 3 | | 9.3733 |
| | Sig. | | .699 | .091 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 9. Data ANOVA dan uji BNT konsentrasi yang berbeda terhadap *Micrococcus sp*

| Konsentrasi (%) | Diameter hambat (mm) | | | Total (mm) | Rerata (mm) | STD |
|------------------------|-----------------------------|----------|----------|-------------------|--------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| A(2,7%) | 10,25 | 10,05 | 10,21 | 30,51 | 10,17 | 0,11 |
| B(4,1%) | 12,05 | 10,23 | 11,25 | 33,53 | 11,18 | 0,91 |
| C(5,4%) | 11,35 | 9,50 | 11,55 | 32,40 | 10,80 | 1,13 |
| D(6,8%) | 12,20 | 11,90 | 12,55 | 36,65 | 12,22 | 0,33 |

ANOVA

| Diameter | | | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| | Sum of Squares | df | | | |
| Between Groups | 6.622 | 3 | 2.207 | 3.965 | .053 |
| Within Groups | 4.453 | 8 | .557 | | |
| Total | 11.075 | 11 | | | |

Diameter

| Konsentrasi | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------------------------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Tukey HSD ^a | | | |
| 2.7 | 3 | 10.1700 | |
| 5.4 | 3 | 10.8000 | 10.8000 |
| 4.1 | 3 | 11.1767 | 11.1767 |
| 6.8 | 3 | | 12.2167 |
| Sig. | | .405 | .171 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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



Lampiran 10. Dokumentasi penelitian



Hasil sentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit 4°C



Medium sebelum diendapkan larutan amonium sulfat jenuh 60%



Medium setelah diendapkan larutan amonium sulfat jenuh 60%



Hasil sentrifugasi larutan presipitasi



Hasil ultrasentrifugasi

Hasil Dialisis

Ekstrak bakteriosin setelah dialisis

