



**POTENSI ANTIBAKTERIAL BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TERASI
TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh :

**M. BASYIRUDDIN HAWALI
NIM. 125080300111139**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2019**



**POTENSI ANTIBAKTERIAL BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TERASI
TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan**

Universitas Brawijaya

Oleh :

**M. BASYIRUDDIN HAWALI
NIM. 125080300111139**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

SKRIPSI

POTENSI ANTIBAKTERIAL BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TERASI
TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli*

Oleh :

M. BASYIRUDDIN HAWALI
NIM. 125080300111139

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 24 juni 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP
NIP. 19581231 198601 2 002
TANGGAL : 16 JUL 2019

Menyetujui,

Dosen Pembimbing II

Bayu Kusuma, S.Pi. M.Sc
NIK. 201605860513 1 001
TANGGAL : 16 JUL 2019

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Dr. H. Muhamad Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1 001
TANGGAL : 16 JUL 2019

**LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **Potensi Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Terasi Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli***

Nama Mahasiswa : M. Basyiruddin Hawali

NIM : 125080300111139

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP

Pembimbing 2 : Bayu Kusuma, S.Pi. M.Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen penguji 1 : Dr. Ir. Yahya, MP

Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS

Tanggal Ujian : 24 Juni 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul "Potensi Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Terasi Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*" adalah karya saya sendiri dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal dari kutipan dari karya yang diterbitkan maupun yang tidak diterbitkan dari penulis telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Malang, Juni 2019

Mahasiswa

M. Basyiruddin Hawali
Nim.125080300111139



LEMBAR UCAPAN TERIMA KASIH

Allahumma sholli ala Syaidina Muhammad, Alhamdulillah wa syukurillah wa ni'matillah. Allah Subhanahu Wa Ta'ala Yang Maha Baik telah memberikan kesempatan yang sangat besar sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul "Potensi Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Terasi Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*"

Begitu banyak bantuan yang diperoleh penulis, maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Segenap keluarga yang selalu mendukung secara dlohiron wa batinan demi menuntaskan laporan tugas akhir studi.
2. Bapak Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP dan Bayu Kusuma, S.Pi. M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah memberikan wejangan dan arahan dalam menyelesaikan laporan skripsi ini.
3. Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang Terkhusus Dosen Prodi Teknologi Hasil Perikanan.
4. Saudara – saudari prodi Teknologi Hasil Perikanan 2012 yang telah banyak memberikan dorongan secara material maupun psikologis.
5. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu – persatu, yang tidak lupa dengan esensi dasar manusianya.

Malang, Mei 2019

Penulis



RINGKASAN

M. Basyiruddin Hawali. Potensi Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Terasi Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*.
(dibawah bimbingan Dr.Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP dan Bayu Kusuma, S.Pi. M.Sc).

Terasi merupakan jenis penyedap makanan berbentuk pasta dan berwarna hitam kecoklatan memiliki aroma dan rasa yang khas, biasanya dijual dalam bentuk bulat atau balok, dibungkus daun pisang, plastik atau kertas. Bakteri asam laktat didefinisikan sebagai kelompok bakteri yang dalam metabolisme karbohidrat menghasilkan asam laktat sebagai produk utama. Bakteri ini terdapat pada bahan makanan baik mentah maupun olahan, terutama dalam bahan makan fermentasi. Senyawa antibakteri adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam konsentrasi kecil dan dapat berspektrum sempit maupun luas yang mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan bakteri. Bakteri asam laktat (BAL) digunakan dalam fermentasi pangan karena BAL dapat mengurai gula menjadi asam organik dan juga dapat menghambat kerusakan pangan yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme pembusuk dengan menghasilkan produk metabolit sebagai senyawa antibakteri.

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme. Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas zat antibakteri adalah pH, suhu stabilitas senyawa, jumlah bakteri yang ada, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolisme bakteri

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri asam laktat yang terdapat pada terasi dan mengetahui bakteri asam laktat yang dihasilkan dari isolasi terasi memiliki aktivitas antibakteri menggunakan bakteri uji *E.coli*. Penelitian ini dilaksanakan pada November 2018-Februari 2019, di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif deskriptif. Metode eksploratif dilakukan untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat dari isolasi terasi dengan bakteri coba *Escheriachia coli*. Dalam proses pertama dilakukan proses penanaman bakteri setelah itu dilakukan pewarnaan gram dan uji aktivitas antibakteri dengan bakteri uji *Escheriachia coli*.

Hasil Penelitian menunjukan bahwa bakteri asam laktat dari terasi udang memiliki potensi terhadap pertumbuhan *Escheriachia coli*. Isolat yang menghasilkan potensi aktivitas antibakterial terdapat pada sampel pengenceran 10^1 sampel terasi b. pengenceran 10^3 sampel terasi a, pengenceran 10^3 sampel terasi b, pengenceran 10^4 sampel terasi c. terasi dari tuban dapat berpotensi menghasilkan aktivitas antibakteri





KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran ALLAH SWT yang telah memberikan rahmat dan berkatNya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul

Potensi Antibakterial Bakteri Asam Laktat Dari Terasi Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*. Atas selesainya penulisan ini, penulis mengucapkan terima

kasih kepada Kedua orang tua yang selalu mendoakan, mendukung dan memotivasi penulis dalam mengerjakan usulan proposal skripsi ini dan ibu Dr. Ir.

Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku dosen pembimbing I serta bapak Bayu Kusuma, S.Pi. M.Sc selaku dosen pembimbing II.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti,

tetapi masih dirasakan banyak kekurangantepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang

membutuhkan.

Malang, Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.5 Kegunaan.....	4
1.6 Jadwal Pelaksanaan.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Terasi.....	5
2.2 Fermentasi.....	5
2.3 Bakteri Asam Laktat.....	8
2.4 Senyawa Antibakteri.....	11
2.4.1 Asam Laktat.....	12
2.4.2 Bakteriosin.....	13
2.5 <i>Eschericia coli</i>	15
2.6 Uji Aktivitas Antimikroba.....	16
2.6.1 Metode Dilusi.....	16
2.6.2 Metode Difusi.....	17
2.6.2.1 Kirby Bauer.....	17
2.6.2.2 Sumuran.....	17
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian.....	18
3.1.1 Bahan Penelitian.....	18
3.1.2 Alat Penelitian.....	18
3.2 Metode Penelitian.....	19
3.3 Prosedur Penelitian.....	20
3.3.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Terasi.....	20
3.3.1.1 Pengenceran.....	20
3.3.1.2 Kultur Bakteri Asam Laktat.....	21
3.3.1.3 Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	22
3.3.2 Identifikasi Bakteri Asam Laktat.....	23
3.3.2.1 Pewarnaan Gram.....	23
3.3.2.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	24
3.4 Analisa Data.....	27



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat 28

4.2 Identifikasi Bakteri Terbaik (Biokimia) 32

 4.2.1 Pewarnaan Gram 32

4.3 Uji Aktivitas Antibakteri 35

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan 40

5.2 Saran 40

DAFTAR PUSTAKA 41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Eschericia coli</i>	13
2. Skema Pengenceran Bakteri Asam Laktat Pada Terasi.....	19
3. Skema Kultur Bakteri Asam Laktat.....	20
4. Skema Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	21
5. Skema Pewarnaan Gram.....	22
6. Skema Uji Antibakteri.....	26
7. Tata Letak <i>Paper Disk</i> Pada Uji Aktivitas Antibakteri.....	26
8. Isolasi Bakteri dari Terasi Udang.....	28
9. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri.....	33
10. Uji aktivitas Antibakteri.....	35
11. Rata-rata Zona Hambat Bakteri.....	36



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Zona Hambat Bakteri.....	30
2. Hasil Pewarnaan Bakteri.....	32



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Lampiran Pewarnaan Gram.....	45
2. Pengenceran.....	49



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Terasi merupakan jenis penyedap makanan berbentuk pasta dan berwarna hitam kecoklatan memiliki aroma dan rasa yang khas, biasanya dijual dalam bentuk bulat atau balok, dibungkus daun pisang, plastik atau kertas.

Produk terasi dapat dijumpai di berbagai negara di Asia, tetapi dengan nama dan proses yang sedikit berbeda, misalnya *hentak*, *ngari*, dan *tungap* di India, *bagoong* di Filipina, *belacan* di Malaysia, *ngapi* di Myanmar, *kapi* di Thailand dan lainnya (Thapa, 2002).

Salah satu produk perikanan setengah basah dengan bahan baku utama udang atau ikan-ikan kecil yang ditambahkan garam, kemudian di fermentasikan salah satunya terasi (Sari *et al.*, 2009). Proses fermentasi biasanya dilakukan secara tradisional yang berlangsung secara spontan yaitu tidak ditambahkan mikroba dalam bentuk *starter* selama fermentasi, fermentasi secara spontan biasanya menggunakan garam untuk menyeleksi mikroba tertentu. Umumnya proses fermentasi secara tradisional hanya mikroba tahan garam yang hidup namun sangat mudah mengalami cemaran bakteri pembusuk dan bakteri patogenik yang tumbuh lebih cepat yang sulit di kontrol (Desniar *et al.*, 2009).

Bakteri asam laktat didefinisikan sebagai kelompok bakteri yang dalam metabolisme karbohidrat menghasilkan asam laktat sebagai produk utama (Stamer, 1979). Bakteri ini terdapat pada bahan makanan baik mentah maupun olahan, terutama dalam bahan makan fermentasi. Dalam produk fermentasi, bakteri asam laktat sering ditemukan sebagai mikroflora dominan yang dapat menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Aktivitas bakteri asam laktat berkaitan dengan adanya produksi asam organik (Tramer, 1966).



Bakteri yang memproduksi asam laktat termasuk ke dalam golongan bakteri gram-positif, sebagian besar bersifat katalase negatif, tidak membentuk spora, berbentuk batang dan coccus. Golongan bakteri asam laktat ini dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen (Fauzan, 2009). Berdasarkan produk akhir dari metabolisme glukosa, bakteri asam laktat dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat yang termasuk homofermentatif dapat mengubah 95 % dari glukosa atau heksosa lainnya menjadi asam laktat.

Pengendalian bakteri pembusuk dan patogen dalam fermentasi dapat dilakukan secara biologis dengan penambahan zat antibakteri. Zat antibakteri tersebut dapat berasal dari metabolit bakteri asam laktat (BAL) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan. Metabolit tersebut antara lain asam organik (asam laktat dan asam asetat) dan komponen antibakteri seperti bakteriosin (Daeschel, 1989). Prinsip fermentasi bahan pangan dengan metode penambahan BAL adalah peningkatan konsentrasi asam laktat dan penurunan pH melalui metabolisme karbohidrat dengan cara mengubah glukosa menjadi asam laktat. Konsentrasi asam laktat yang relatif tinggi akan menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*, sehingga produk pangan terfermentasi yang dihasilkan akan aman bagi konsumen (Aryanta, 2007). *E.coli* merupakan bakteri komensal bersifat patogen menyebabkan gangguan kesehatan pada saluran pencernaan (Tenailon *et al.*, 2010). *E. coli* yang bersifat patogen dapat mengakibatkan gangguan intestinal dan infeksi saluran kemih (Prescott, 2008).

Senyawa antibakteri adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam konsentrasi kecil dan dapat berspektrum sempit maupun luas yang mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan bakteri.

Bakteri asam laktat (BAL) digunakan dalam fermentasi pangan karena BAL dapat mengurai gula menjadi asam organik dan juga dapat menghambat kerusakan



pangan yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme pembusuk dengan menghasilkan produk metabolit sebagai senyawa antibakteri.

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

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi bakteri asam laktat dari terasi dan melihat kemampuannya sebagai antibakterial terhadap bakteri *E. coli*.



1.2 Perumusan Masalah

Adapun perumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah bakteri asam laktat terdapat pada terasi?
2. Bagaimana bakteri asam laktat yang dihasilkan dari isolasi terasi memiliki aktivitas antibakteri?

1.3 Tujuan

Adapun penelitian ini bertujuan untuk:

1. Memperoleh isolat bakteri asam laktat yang terdapat pada terasi.
2. Mengetahui bakteri asam laktat yang dihasilkan dari isolasi terasi memiliki aktivitas antibakteri.

1.4 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi bakteri asam laktat pada terasi sebagai antibakteri yang dapat dimanfaatkan dalam industri pangan dan lainnya

1.6 Jadwal Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya pada bulan November 2018 - Februari 2019.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Terasi

Masyarakat Asia Tenggara termasuk Indonesia begitu menyukai olahan fermentasi tersebut karena harganya terjangkau, mudah didapat dan memiliki flavor berupa rasa dan aroma yang khas. Terasi mempunyai kandungan gizi yang cukup lengkap. Di dalam terasi terkandung protein, lemak, karbohidrat, mineral, kalsium, fosfor, besi dan air. Di samping itu, terasi mengandung vitamin B 12 dan asam amino. Kualitas terasi berupa aroma dan cita rasa dapat dipengaruhi oleh lamanya waktu fermentasi. Semakin cepat waktu fermentasi maka semakin bagus kualitas terasi tersebut. Selain itu cita rasa terasi dipengaruhi juga oleh bahan baku yang dipergunakan. Cita rasa terasi dari bahan baku rebon/udang akan berbeda dengan terasi dari bahan baku ikan (Suprapti, 2002).

Terasi merupakan salah satu produk pangan hasil fermentasi dari bahan baku ikan atau udang yang hanya mengalami perlakuan penggaraman (tanpa diikuti dengan penambahan asam), kemudian dibiarkan beberapa hari agar terjadi proses fermentasi. Proses fermentasi dapat berlangsung karena adanya aktivitas enzim yang berasal dari tubuh ikan (atau udang) itu sendiri (Martasuganda *et.al.*, 2004).

2.2 Fermentasi

Proses fermentasi merupakan proses biokimia dimana terjadi reaksi kimia dengan bantuan mikroba. Akibat proses fermentasi menyebabkan sebagian atau seluruh substrat akan berubah menjadi alkohol setelah beberapa waktu lamanya. Adapun faktor-faktor yang dapat mempengaruhi berlangsungnya proses



fermentasi yaitu substrat, suhu, lama fermentasi, derajat keasaman (pH), dan mikroba (starter) (Endah *et al.*, 2007).

Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang mengandung banyak nutrisi yang dibutuhkan mikroba untuk proses pertumbuhannya dan menghasilkan produk fermentasi. Nutrien yang paling dibutuhkan oleh mikroba adalah karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai penghasil energi bagi mikroba. Selain karbohidrat mikroba juga membutuhkan jenis nutrisi lain seperti protein namun jumlah yang dibutuhkan berbeda. Kebutuhan protein untuk pertumbuhan mikroba dan proses fermentasi cenderung lebih sedikit dibanding dengan karbohidrat (Azizah *et al.*, 2012).

Suhu merupakan faktor yang dapat mempengaruhi berlangsungnya proses fermentasi. Pertumbuhan mikroba dipengaruhi suhu lingkungan fermentasi selain suhu, lama fermentasi dapat menentukan produk akhir dari proses fermentasi. Mikroba memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda. Menurut Fardiaz (1992), *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kisaran suhu pertumbuhan antara 20 – 30°C. Pada penelitian lain disebutkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* akan tumbuh optimal pada kisaran suhu 30 – 35°C dan puncak produksi alkohol dicapai pada suhu 33°C. Jika suhu terlalu rendah maka fermentasi akan berlangsung secara lambat dan sebaliknya jika suhu terlalu tinggi maka *Saccharomyces cerevisiae* akan mati sehingga proses fermentasi tidak dapat berlangsung (Kumalasari, 2011). Lama fermentasi berkaitan dengan fase pertumbuhan mikroba. Terdapat 4 fase pertumbuhan mikroba meliputi fase adaptasi, fase tumbuh cepat, fase stasioner, dan fase kematian.

Derajat keasaman (pH) adalah salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan dalam melakukan proses fermentasi. pH dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba selama proses fermentasi berlangsung. Oleh karena itu

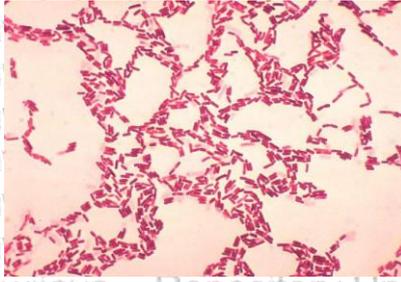


dalam melaksanakan penelitian, alangkah baiknya substrat yang akan digunakan diuji terlebih dahulu pH nya. Selain pH, oksigen juga dapat mempengaruhi lama fermentasi. Beberapa jenis mikroba akan tumbuh dengan baik dengan kondisi aerob, misalnya *Saccharomyces cerevisiae* (Elevri dan Putra, 2006).

Selain faktor-faktor diatas, satu faktor yang sangat berperan penting dalam berlangsungnya proses fermentasi adalah mikroba. Menurut O'leary *et al.* (2004), mikroba adalah pelaku fermentasi dimana masing-masing mikroba memiliki kelebihan dan kekurangan. Contohnya mikroba jenis *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir yang biasa digunakan dalam fermentasi alkohol. Mikroba jenis ini memiliki kemampuan mengkonversi gula lebih cepat dari pada jenis mikroba lain namun *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat memanfaatkan galaktosa sebagai sumber karbonnya (Azizah *et al.*, 2012).

Macam-macam bakteri yang terdapat pada terasi menurut Setiawan *et al.* (2007), meliputi: *Bacillus* sp. merupakan jenis bakteri yang berbentuk basil/batang, bersifat gram positif, motil, katalase positif, oksidase negatif dan bersifat oksidatif-fermentatif (Cowan and Steel, 1974). Keberadaan *Bacillus* sp. sangat diharapkan keberadaannya terutama untuk proses fermentasi terasi udang. Menurut Hommes (2012), bakteri jenis *B. Mycoides* banyak digunakan sebagai starter dalam mempercepat proses fermentasi pada berbagai bahan pangan. Namun salah satu spesiesnya yaitu *Bacillus subtilis* merupakan penyebab kerusakan pangan (food borne) pada produk susu (Kontiranta, 2000).

Staphylococcus sp. merupakan bakteri yang berbentuk kokus, gram positif, nonmotil, katalase positif, oksidase negatif dan bersifat fermentatif (Cowan dan Steel, 1974). Menurut Hammer (2012), menyatakan bahwa



Gambar 1. Bakteri Asam Laktat (Holt, *et al*, 2000):

Bakteri yang memproduksi asam laktat termasuk ke dalam golongan bakteri Gram-positif, sebagian besar bersifat katalase negatif. Golongan bakteri asam laktat ini dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen. BAL mempunyai karakteristik morfologi, fisiologi dan metabolit tertentu. Deskripsi secara umum dari bakteri ini adalah termasuk dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat maupun batang dan menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama memfermentasi karbohidrat (Axelsson, 2004).

Lebih lanjut dinyatakan oleh Jay (1998), bakteri asam laktat bersifat mesofilik dan termofilik, beberapa dapat tumbuh pada suhu 5°C dan tertinggi 45°C, dapat bertahan pada pH 1,2 - 9,6 dan beberapa hanya dapat tumbuh pada kisaran pH yang sempit (pH 4,0 - 4,5). Bakteri ini termasuk mikroorganisme GRAS (Generally Recognized as Safe) atau golongan mikroorganisme yang aman ditambahkan dalam makanan karena sifatnya yang tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, yang dikenal dengan sebutan "food grade microorganism", yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan (Alokomi *et al.*, 2000). Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang mempunyai peranan penting dalam proses fermentasi, salah satu peran penting tersebut yaitu menghasilkan komponen antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk (Lawalata *et al.*, 2010).

Berdasarkan produk akhir dari metabolisme glukosa, bakteri asam laktat dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif.



Bakteri asam laktat yang termasuk homofermentatif dapat mengubah 95 % dari glukosa atau heksosa lainnya menjadi asam laktat.

Beberapa contoh bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Pada bakteri heterofermentatif, bakteri asam laktat juga memproduksi asam asetat dan sebagian asam propionat dalam jumlah besar. (Theron dan Lues 2011).

Bakteri asam laktat heterofermentatif mengubah glukosa dan heksosa lainnya menjadi asam laktat, etanol, asam asetat, asam format dan CO dalam jumlah yang hampir sama. Beberapa contoh bakteri asam laktat heterofermentatif adalah *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Bakteri heterofermentatif tidak mempunyai enzim fruktosadifosfat, aldolase, transaldolase dan transketolase yang berperan dalam tahap glikolisis. Bakteri homofermentatif dapat menghasilkan energi sebesar dua kali energi yang dihasilkan oleh bakteri heterofermentatif dari sejumlah substrat yang sama (Moat *et al.*, 2002).

Sejauh ini telah diketahui bahwa keberadaan bakteri asam laktat tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan sehingga sering digunakan dalam industri pengawetan makanan, minuman dan berpotensi sebagai produk probiotik. Beberapa kriteria penting untuk karakter fisiologi yang merupakan seleksi kelayakan bakteri sebagai produk probiotik antara lain uji pertumbuhan/resistensi bakteri probiotik pada pH rendah (Hardiningsih *et al.*, 2005).

BAL dapat berfungsi sebagai pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungannya dan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen



seperti H, diasetil, CO, asetaldehid, d-isomer asam-asam amino dan bakteriosin (Kusmiati, 2002).

Bakteri Asam Laktat menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri patogen (Usmiati, 2007).

2.4 Senyawa Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme. Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas zat antibakteri adalah pH, suhu stabilitas senyawa, jumlah bakteri yang ada, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolisme bakteri. (Nilsson *et al.*, 2000).

Mekanisme kerja antibakteri yaitu pertama merusak dinding sel, dinding sel adalah lapisan luar yang kaku pada bakteri yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran sitoplasma dibawahnya. Dinding sel juga dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah terbentuk. Protein sel juga terdenaturasi dan terjadi kerusakan sistem metabolisme di dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler (Pelczar dan Rheid, 1986).

Normalnya, strain bakteri gram positif sensitif terhadap bakteriosin dengan spektrum yang sangat bervariasi, sedangkan strain bakteri Gram negative resisten terhadap bakteriosin (Branen, 1993). Namun, bakteri Gram negative tersebut dapat menjadi sensitif mengikuti kerusakan struktur

lipopolisakarida pada permukaan sel secara fisik dan tekanan kimia. Bakteriosin asal bakteri asam laktat kurang dalam menghambat bakteri gram negatif karena membran terluarnya bersifat hidrofilik dan dapat menghalangi aksi bakteriosin (Ray, 2000).

2.4.1 Asam Laktat

Asam laktat merupakan molekul yang larut dalam air. Mekanisme antimikroba asam laktat berdasarkan pada teori *chemiosmotic* dan pH homeostasis. Ketika asam laktat yang diproduksi disekresikan ke lingkungan, beberapa molekul terdisosiasi menjadi H+ dan anion, sementara yang lain tidak terdisosiasi. Salah satu faktor yang berperan terhadap terdisosiasi atau tidaknya suatu molekul adalah pH lingkungan dan pK (tetapan keseimbangan).

Hal ini menyebabkan peningkatan proton transmembran yang pada akhirnya menyebabkan gradien proton. Perbedaan ini menyebabkan proton lebih cepat masuk ke dalam sel sehingga meningkatkan kebutuhan energi untuk mempertahankan pH alkali dalam sel (Ray, 2004).

Aktivitas antibakteri dari asam laktat selain memaksa zat antibakteri lain masuk, juga memiliki perannya tersendiri. Asam yang masuk melalui plasma membran sel akan terdisosiasi menjadi kation dan anion toksik. Membran sel akan luruh dan menyebabkan transportasi sel terganggu. Selain itu aktivitas air bebas (water activity) dan metabolisme sel seperti glikolisis juga akan terganggu (Theron dan Lues, 2011).

Asam laktat mampu melemahkan permeabilitas bakteri gram-negatif dengan merusak membran luar bakteri gram-negatif. Pelindung dari permeabilitas membran luar berupa lapisan lipopolisakarida yang terletak pada permukaan membran dirusak oleh asam laktat sehingga substrat antimikroba



yang lain yaitu diasetil, bakteriosin, hidrogen peroksida dan laktoperidase sistem dapat berpenetrasi ke dalam membrane sitoplasma (Alokomi *et al.*, 2000).

Karbon dioksida diproduksi terutama oleh BAL heterofermentatif. Karbon dioksida memainkan peranan penting dalam membuat lingkungan anaerobik yang menghambat enzimatik dekarboksilase, dan akumulasi CO membran lipid bila terdapat menyebabkan disfungsi permeabilitas. Karbon dioksida secara efektif dapat menghambat banyak mikroorganisme perusak makanan, terutama bakteri psikrotropik Gram-negatif (Ammor *et al.*, 2006).

Hidrogen peroksida merupakan prekursor untuk produksi bakterisidal radikal bebas seperti super oksida dan radikal hidroksil (OH) yang dapat merusak DNA. Hidrogen peroksida diproduksi oleh bakteri asam laktat sebagai hasil dari aksi flavor protein oksidase atau nikotinamida adenine dinukleotida (NADH) peroksidase. Efek antimikroba dari adalah hasil dari oksidasi yang menyebabkan denaturasi sejumlah enzim, dan dari peroksidase membrane lipid meningkatkan permeabilitas membran (Ammor *et al.*, 2006).

2.4.2 Bakteriosin

Bakteriosin adalah senyawa protein yang dieksresikan oleh bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama yang memiliki kekerabatan erat secara filogenik (Kusmiati, 2002).

Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut:

- molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel,
- proses kontak ini mampu mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat,
- ketidak stabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap

Proton Motive Force (PMF) (Usmiati, 2007).



Bakteriosin dapat diproduksi oleh *Lactococcus*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus* yang berasal dari berbagai bahan makanan, misalnya nisin diproduksi oleh *Lactococcus lactis*, pediosin dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactis*. Bakteriosin memiliki beberapa kelebihan sehingga potensial digunakan sebagai biopreservatif. Bakteriosin bukan termasuk bahan toksik dan mudah mengalami degradasi oleh enzim proteolitik karena merupakan senyawa protein. Bakteriosin juga tidak membahayakan mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan. Bakteriosin dapat digunakan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pengawet pangan. Penggunaan bakteriosin fleksibel dan stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin (Marwati, 2007).

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 additive atau bumbu perasa, starter bakteriogenik, bahan tambahan untuk melindungi kultur mikroba, bakteriosin yang dimobilisasi dapat digunakan sebagai bioaktif pengemasan bahan makanan (Galve et al., 2007).



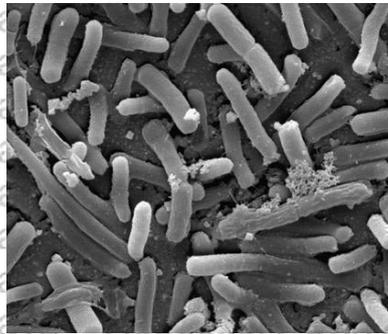


2.5 *Escherichia coli*

Klasifikasi bakteri *E. coli* menurut (Hardjoeno, 2007), adalah sebagai berikut:

Domain : Bacteria
 Kingdom : Eubacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gamma proteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *E. coli*

Bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. *E. coli* (Chen *et al.*, 2012)

E. coli merupakan bakteri Gram (-) negatif, motil, tidak berspora, berbentuk batang dan anaerobik fakultatif. *E. coli* bersifat aerob atau kualitatifan aerob, dapat tumbuh pada media buatan. Bakteri ini umumnya hidup pada rentang suhu 20 - 40°C dengan suhu optimum 37°C, tumbuh baik pada pH 7,0 tapi tumbuh juga pada pH yang lebih tinggi. *E. coli* mengandung enterotoksin dan atau faktor virulensi lainnya, termasuk invasiveness dan faktor kolonisasi, menyebabkan penyakit diare. *E. coli* juga penyebab utama infeksi urin dan



infeksinosomical termasuk septisemia dan meningitis. Dari sekian ratusstrain *E.coli* yang teridentifikasi, hanya sebagian kecil yang bersifat pathogen (Holt *et al.*, 1994).

E.coli merupakan bakteri komensal bersifat patogen menyebabkan gangguan kesehatan pada saluran pencernaan (Tenailon *et al.*, 2010). *E. coli* yang berifat patogen dapat mengakibatkan gangguan intestinal dan infeksi saluran kemih (Prescott, 2008).

2.6 Uji Aktivitas Antimikroba

Tujuan pengukuran aktivitas antibakteri adalah untuk menentukan potensi suatu zat yang diduga atau telah memiki aktivitas sebagai antibakteri dalam larutan terhadap suatu bakteri (Jawetz *et al.*, 2001). Uji aktivitas antibakteri digunakan untuk menentukan kepekaan suatu bakteri pathogen. Uji antibakteri dibedakan menjadi dua yaitu metode dilusi dan metode difusi.

2.6.1 Metode Dilusi

Keuntungan utama dari metode dilusi dapat memperkirakan konsentrasi senyawa uji dalam medium agar atau suspense broth. Pada metode dilusi agar, medium diinokulasi dengan organisme uji dan sampel yang diuji dicampur dengan inokulum. Material yang diinokulasi dan pertumbuhan bakteri dilihat. Pengujian diulang dengan variasi dilusi sampel uji dalam medium kultur dan menentukan dilusi yang paling tinggi dapat dicegah pertumbuhannya (Rahman *et al.*, 2010). Dalam tabung uji, berbagai konsentrasi senyawa uji dicampur dengan suspense bakteri pada beberapa tabung, konsentrasi terendah menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Pada uji mikro dilusi cair, bakteri yang tumbuh disumur plat, dimana berbagai kosentrasi senyawa uji ditambahkan. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dengan adanya kekeruhan dalam sumuran yang dibuat (Choma *et al.*, 2010).



2.6.2 Metode Difusi

Metode difusi digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih pada permukaan media agar mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba (Pratiwi, 2008). Metode difusi agar dibedakan menjadi dua yaitu cara Kirby Bauer dan cara Sumuran.

- **Kirby Bauer**

Metode difusi disk (tes Kirby Bauer) dilakukan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008). Keunggulan uji difusi cakram agar mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa (Sacher dan McPherson, 2004).

- **Sumuran**

Metode ini serupa dengan metode difusi disk, di mana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, 2008). Metode sumuran hal pertama yang dilakukan yakni mengoleskan bakteri uji pada permukaan media agar seperti yang dilakukan pada uji Kirby Bauer. Selanjutnya dilakukan pembuatan sumuran pada media agar dengan diameter tertentu yang kemudian diisi dengan agen antibakteri. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, pengamatan dilakukan dengan melihat ada tidaknya diameter hambat disekitar sumuran (Lorian, 1980).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah terasi udang yang diperoleh dari Tuban, Jawa Timur. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengenceran antara lain, *aluminium foil*, tisu dan kertas label, bluetip, NaFisiologi 0.9%, aquades, spirtus, sarung tangan, air, alkohol 70%. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan untuk penanaman bakteri yaitu MRSA (deMann Rogosa Sharpe Agar), CaCO₃ 1%, kertas label, kapas, karet gelang aquades, *aluminium foil* dan tisu, cawan petri disposable, spirtus. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada pemurnian bakteri yaitu, MRSA, cawan petri dispossable, aquades, aluminium foil, kertas label, tisu, plastik wrap, dan spirtus.

Dan bahan-bahan yang digunakan untuk identifikasi bakteri berdasarkan uji pewarnaan gram adalah *yellow tip*, *safranin*, *iodin*, kristal ungu, bakteri diperoleh dari isolat terasi, air, alkohol 70%, minyak immersi, aquades, kapas, tisu, kertas label, dan spirtus. Sedangkan bahan yang digunakan untuk uji antibakteri adalah sampel berupa bakteri *E. coli* yang telah ditumbuhkan pada media LB (Luria Bertani), isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media MRSB, testdisk, cotton swap, MHA (Mueller-Hinton Agar) spirtus, alkohol 70%, kertas label, tisu, plastik wrap, dan appendorf.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat yang digunakan dalam proses persiapan sampel dan pengenceran diantaranya adalah mortal alu, timbangan digital, tabung reaksi, rak tabung, pipet volume, *bola hisap*, *mikro pipet*, bunsen, autoklaf, *crushtable tank*, dan kompor. Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam penanaman bakteri dan pembuatan media adalah mikro



pipet, bunsen, *beaker glass* 100 mL, *triangle*, korek api, inkubator, dan *tube* anaerob. Alat-alat yang digunakan dalam melakukan permurnian bakteri diantaranya adalah jarum ose, bunsen, korek api, dan inkubator. Alat-alat yang digunakan pada identifikasi bakteri berdasarkan uji pewarnaan gram adalah mikroskop, objek glass, cover glass, pipet tetes, *beaker glass* 1000 mL, *beaker glass* 100 mL, *sprayer*, *washing bottle*, bunsen, jarum ose, rak tabung reaksi, dan mikro pipet. Alat yang digunakan untuk uji antibakteri yaitu *sentrifuge*, bunsen, korek api, mikro pipet, dan inkubator.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ada metode yang bersifat eksploratif deskriptif (non hipotesa). Metode eksploratif dilakukan untuk mencapai tujuan yang utama yakni mengetahui potensi antibakterial bakteri asam laktat dari isolasi terasi dengan bakteri uji coba *E coli*.

Metode eksploratif merupakan penelitian yang dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak sama sekali. Menurut Sandjaya dan Heriyanto (2006), penelitian ekloratif deskriptif bertujuan untuk mendeskripsikan gejala-gejala yang terjadi pada masa itu.

Desain penelitian ini biasanya hanya melibatkan satu variabel saja. Penelitian eksploratif deskriptif umumnya tidak hendak menguji hepotesa, melainkan hanya memaparkan suatu objek apa adanya secara sistematik.



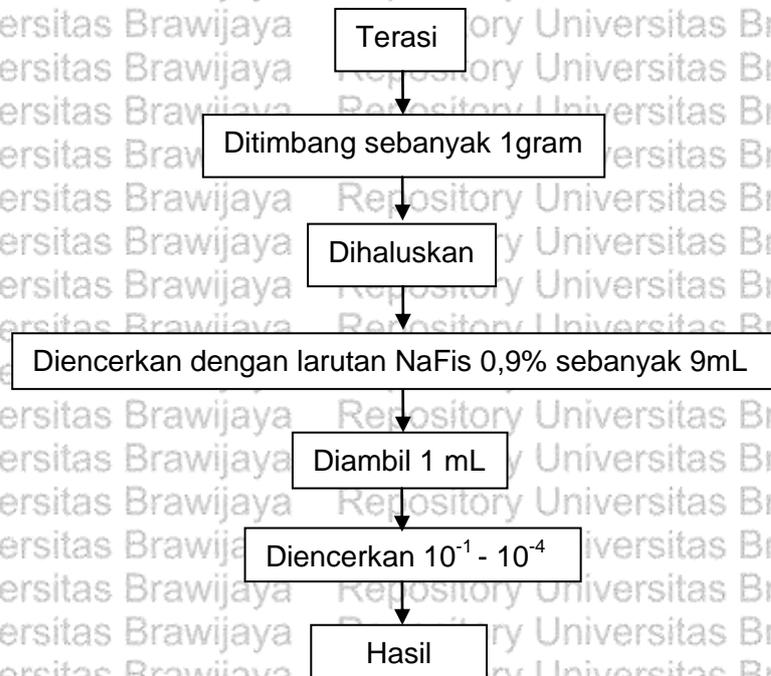
3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Terasi

Tahapan isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) terdiri dari pengenceran, kultur bakteri asam laktat, dan pemurnian bakteri asam laktat.

3.3.1.1 Pengenceran (Romadlon *et al.*, 2018)

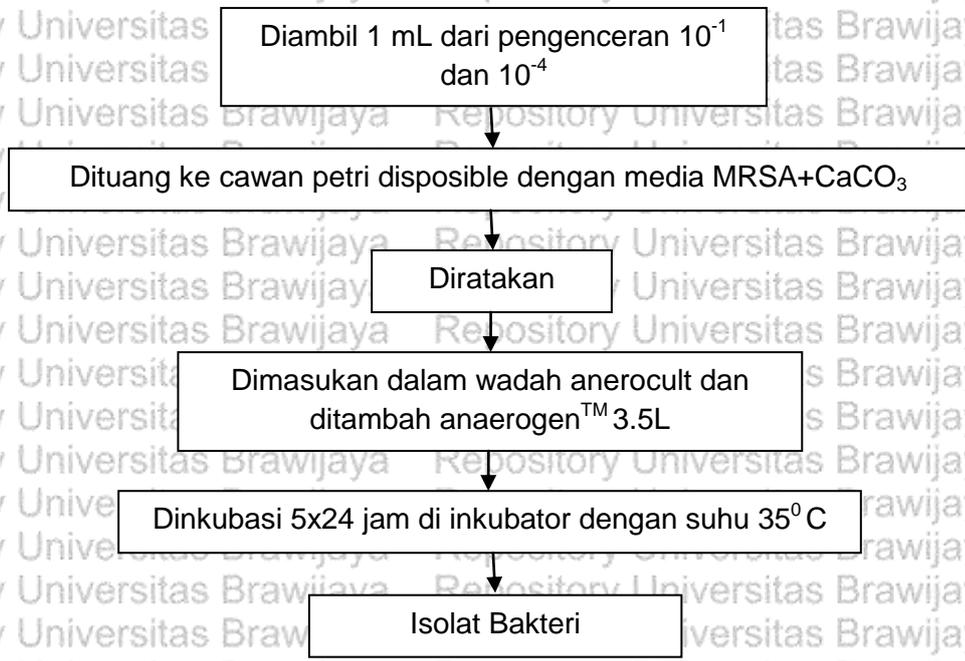
Terasi ditimbang menggunakan timbangan digital, diambil sampel terasi sebanyak 1gram. Kemudian dihaluskan menggunakan mortal alu dengan tujuan menghaluskan sampel agar mudah untuk diencerkan dalam pelarut NaFis 0,9%. Selanjutnya, sampel yang telah diencerkan diambil 1mL lalu dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilakukan pengenceran dari 10^{-1} - 10^{-4} . Tujuan pengenceran 10^{-1} - 10^{-4} untuk mengurai kepadatan bakteri yang terdapat pada terasi. Metode pengenceran bakteri asam laktat pada terasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema pengenceran bakteri asam laktat pada terasi yang dimodifikasi (Romadlon *et al.*, 2108)

3.3.1.2 Kultur Bakteri Asam Laktat (Wikandari et al., 2012)

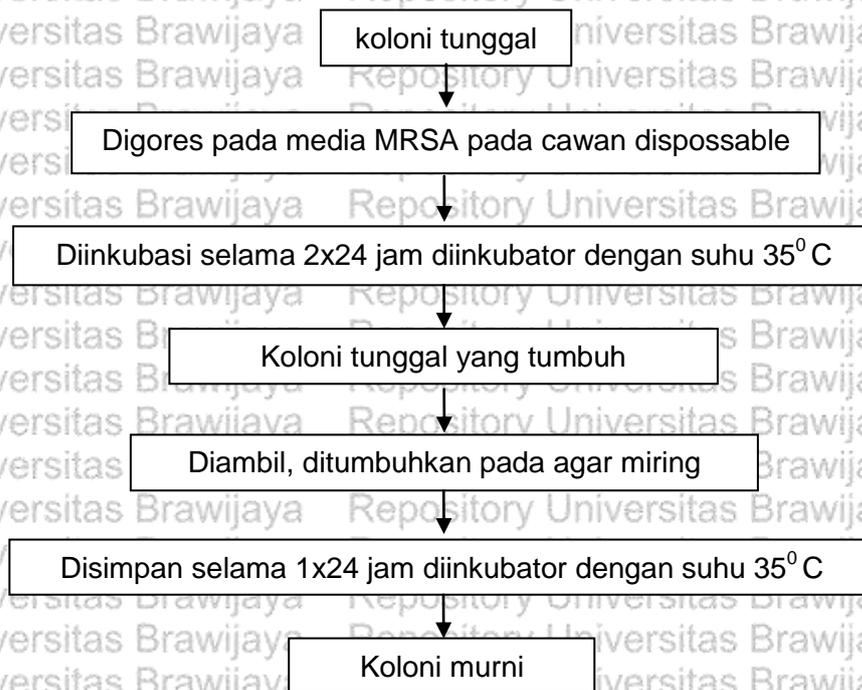
Kultur bakteri asam laktat menggunakan media MRSA + CaCO₃ 1% dalam kondisi anaerob. Pada tahap pertama penanaman bakteri, hasil pengenceran 10¹ - 10⁴ dengan cara diambil 1 mL dengan menggunakan mikro pipet, setelah itu tuang cairan kedalam cawan petri disposable yang berisi media MRSA + CaCO₃ 1% menggunakan metode *pour plate*. Selanjutnya, diratakan menggunakan *triangle*. Masukkan dalam wadah kultur anaerob (*anerocult*) yang didalamnya ditambahkan anaerogen™ 3.5L bertujuan untuk mengkondisikan anaerob setelah itu diinkubasi selama 5x24 jam dengan suhu 35°C didalam inkubator. Kultur bakteri yang tumbuh dimurnikan. Metode kultur bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema kultur bakteri asam laktat yang dimodifikasi (Wikandari et al., 2012)

3.3.1.3 Pemurnian Bakteri Asam Laktat (Rinto, 2011)

Dalam pemurnian bakteri asam laktat, tahap pertama yang dilakukan memilih koloni tunggal yang tumbuh pada media MRSA + CaCO_3 dengan membandingkan warna, bentuk tepian, elevasi koloni. Koloni yang berbeda selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan metode gores 3 kuadran pada media MRSA. Setelah itu diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 35°C . Koloni yang tumbuh pada hasil gores 3 kuadran selanjutnya ditumbuhkan dalam agar miring lalu diinkubasi selama 1x24 jam diinkubator dengan suhu 35°C . Metode pemurnian bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema pemurnian bakteri asam laktat yang dimodifikasi (Rinto, 2011)

3.3.2 Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Dalam penelitian ini uji identifikasi bakteri meliputi pewarnaan gram dan pengujian aktivitas antibakteri.

3.3.2.1 Pewarnaan Gram (Yuswananda, 2015)

Prosedur pewarnaan gram pertama-tama ambil koloni dari media penanaman dengan jarum ose steril, kemudian ratakan pada kaca objek.

Fiksasi preparat dengan melewati di atas api bunsen sebanyak 8 - 10 kali atau hingga kering. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan

kristal ungu didiamkan selama 3 menit agar zat warna menyerap pada bakteri, kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Lalu teteskan iodin

dan didiamkan selama 3 menit, kemudian bilas dengan air yang mengalir. Setelah itu teteskan alkohol 70% lalu dibilas dengan air yang mengalir.

Tetesan safranin dan diamkan selama 45 - 60 detik dan bilas dengan air yang mengalir. Setelah selesai, kaca preparat dikeringkan dengan tisu.

Selanjutnya teteskan minyak immersi sebanyak 1 tetes dan dilihat di mikroskop dengan perbesaran 100x. Berikutnya hasil pewarnaan gram

tersebut didokumentasikan. Metode pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Metode pewarnaan gram yang dimodifikasi (Yuwasnanda, 2015)

3.3.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri (Harley et al., 2002)

Dalam uji aktivitas antibakteri, dilakukan dengan melakukan pengujian aktivitas daya hambat terhadap mikroba patogen pangan. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi (*disk diffusion*) menggunakan kertas cakram (*paper disk*). Bakteri yang digunakan untuk uji antibakteri yaitu bakteri *E. coli*.

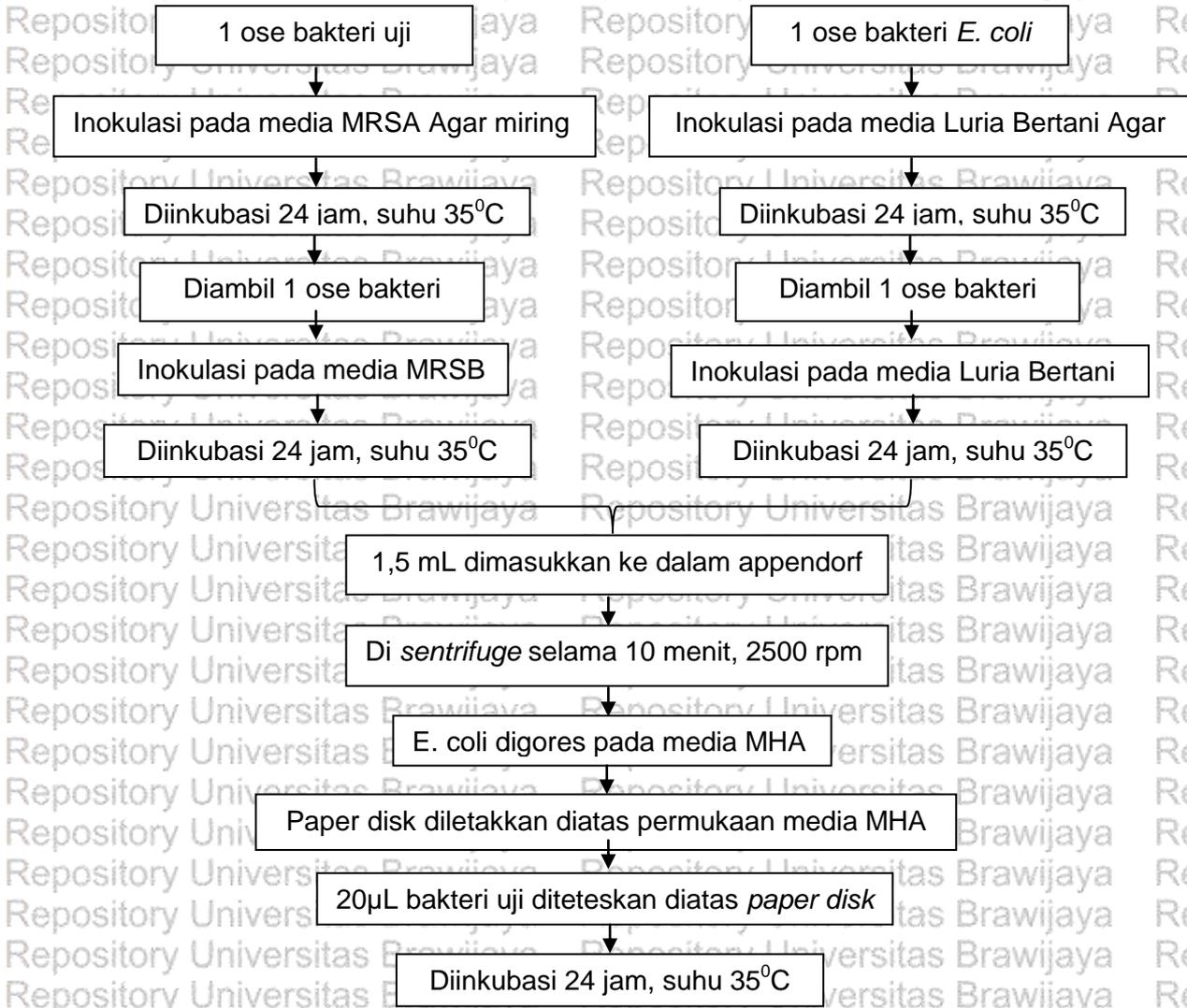
Langkah awal yang dilakukan yakni menginokulasi 1 ose isolat bakteri BAL pada media MRSA miring. Media yang telah berisi isolat diinkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 35°C. Selanjutnya, isolat diinokulasikan pada media MRSB, diinkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 35°C. Perlakuan yang sama dilakukan pada bakteri *E.coli* dengan menumbuhkan di media Luria Bertani Agar



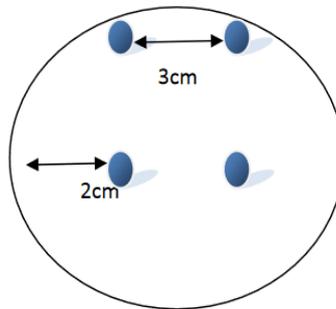
(LBA) miring dan diinkubasi dengan suhu 35°C. Kemudian isolat diinokulasikan pada media LB, diinkubasi selama 1x24 jam diinkubator dengan suhu 35°C. Selanjutnya, isolat diinokulasikan kedalam 5ml aquades steril dan divorteks. Suspense aquades tersebut kemudian dimasukkan pada cuvet steril dan dilanjutkan dengan pengukuran jumlah sel menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui kepadatan bakteri.

Langkah selanjutnya yakni mengambil isolat bakteri BAL dan *E. coli* sebanyak 1,5 mL kedalam appendorf. Kemudian *sentrifuge* pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit agar koloni bakteri yang homogen pada media terpisah. Isolat bakteri *E. coli* diinokulasikan pada media MHA dengan metode gores menggunakan cotton swab. Kemudian *paper disk* (diameter 6 mm) yang telah di isi dengan 20µL, diletakkan diatas permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah distreak dengan isolat bakteri *E. coli* dengan kepadatan 10⁸. Metode uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada gambar 6.

Pada metode ini, penempatan *paper disk* pada media agar memiliki syarat tertentu, yakni setiap *paper disk* harus memiliki jarak yang sama, yaitu 2 cm dari tepi cawan dan jarak antar *paper disk* yaitu 3 cm. Selanjutnya cawan petri disposable diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Besarnya aktifitas antibakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter zona bening penghambatan bakteri menggunakan jangka sorong. Diameter Penghambatan zona bening dinyatakan dalam satuan millimeter (mm). Tata letak *paper disk* pada media MHA untuk uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Metode uji aktivitas antibakteri yang dimodifikasi (Harley et al., 2002)



Gambar 7. Tata letak paper disk pada uji aktivitas antibakteri



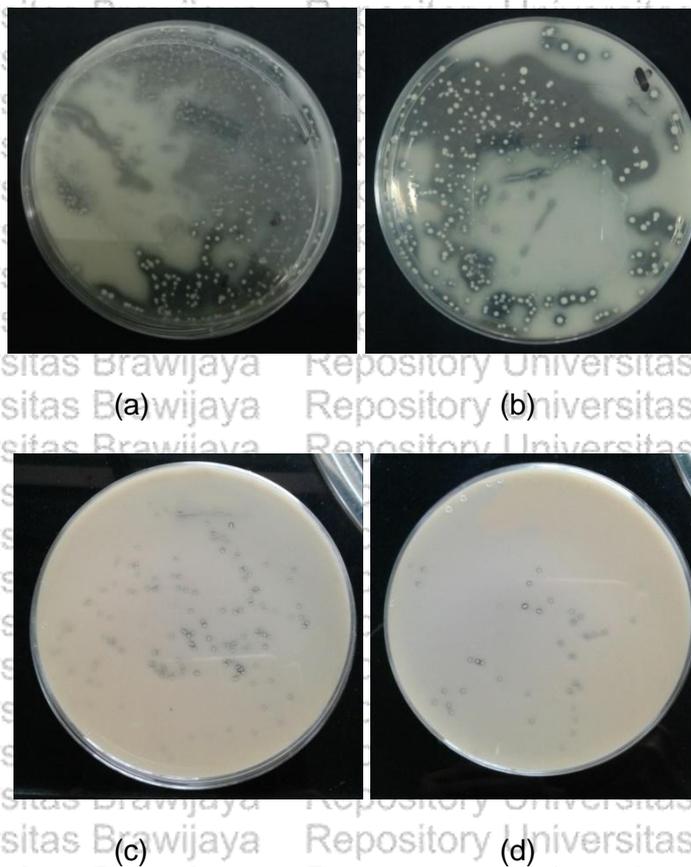
3.4 Analisa Data

Data yang didapatkan dari penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Parameter yang diamati yakni pewarnaan gram dan zona bening yang terbentuk dari uji aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh BAL terhadap *E. coli*.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi merupakan tahap awal sebelum dilakukannya karakterisasi bakteri asam laktat pada terasi udang yang diperoleh dari Tuban, Jawa Timur. Koloni yang tumbuh terdiri dari sel-sel mikroba yang berkumpul menjadi satu. Pada tahap isolat bakteri diperoleh dari hasil pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} , pada masing-masing cawan ditemukan yaitu 235 isolat, 215 isolat, 175 isolat dan 81 isolat. Hasil isolasi bakteri terasi udang dari masing-masing pengenceran dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Isolasi Bakteri dari Terasi Udang (a) Pengenceran 10^{-1} , (b) Pengenceran 10^{-2} , (c) Pengenceran 10^{-3} , (d) Pengenceran 10^{-4}

Berdasarkan Gambar 8 diperoleh dari masing-masing pengenceran koloni bakteri yang tumbuh tampak berbeda. Pada hasil pengenceran 10^{-1} terlihat koloni bakteri lebih banyak dari pengenceran yang lain, yakni hampir seperempat cawan. Sedangkan pada pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} koloni bakteri yang tumbuh terlihat semakin rendah. Semakin rendah pengenceran, koloni bakteri yang tumbuh semakin sedikit. Isolasi bakteri asam laktat dilakukan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Bakteri tersebut dipilih berdasarkan zona bening yang dihasilkan. Menurut Subagiyo *et al.* (2017), isolasi BAL dilakukan dengan teknik *pourplate* menggunakan medium MRS Agar yang diperkaya dengan CaCO_3 . Koloni yang menghasilkan asam ditunjukkan oleh terbentuknya zona jernih di sekitar koloni. Zona jernih ini merupakan hasil reaksi asam yang diproduksi oleh koloni bakteri dengan CaCO_3 yang ada pada medium isolasi.

Zona jernih di sekitar koloni bakteri asam laktat terbentuk sebagai akibat penetralan oleh CaCO_3 terhadap asam yang dihasilkan bakteri. Beberapa ciri yang dimiliki oleh bakteri asam laktat adalah Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk bulat atau batang dan pada umumnya tidak memiliki katalase. Pengamatan mikroskopik bakteri yang paling dominan adalah bakteri berbentuk batang (Utama *et al.*, 2018).

Bakteri asam laktat biasanya ditumbuhkan pada media de Mann Rogose and Sharpe (MRS). Media MRS merupakan media spesifik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Kandungan protein dari kasein digunakan sebagai sumber nitrogen dan sumber karbon diharapkan dapat menjadi media tumbuh yang baik untuk bakteri. bakteri asam laktat akan tumbuh pada media



yang sesuai untuk pertumbuhan dan kemampuan menghasilkan asam pada media (Safitri *et al.*, 2016).

Kalsium karbonat berfungsi sebagai buffer sekaligus seleksi awal pada bakteri penghasil asam laktat. Asam laktat akan menyebabkan zona jernih disekeliling koloni. Hal ini disebabkan bakteri memiliki kemampuan untuk melarutkan kalsium karbonat sehingga dapat digunakan sebagai penanda awal koloni bakteri asam laktat (Seelly *et al.*, 2001).

Nutrisi utama yang dibutuhkan oleh BAL adalah sumber karbon dan nitrogen (Azizah *et al.* 2012). Bakteri asam laktat menggunakan sumber karbon sebagai sumber energi dan bahan pembentuk asam laktat, sedangkan nitrogen digunakan sebagai bahan pembentuk biomassa sel. Bakteri asam laktat pada fase pertumbuhan memanfaatkan protein sebagai sumber nitrogen, yang digunakan oleh bakteri untuk sintesis protein, asam amino (Nisa *et al.* 2001).

Dalam penelitiannya Yeni (2016) menyatakan bahwa sumber karbon yang baik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah glukosa. Glukosa sebagai monosakarida merupakan senyawa yang langsung dapat digunakan secara penuh oleh bakteri asam laktat dalam metabolismenya.

Setelah dilakukan seleksi awal isolat bakteri asam laktat berdasarkan zona bening, kemudian dilakukan pengamatan morfologi makroskopik bakteri.

Pengamatan ini dilakukan dengan cara melihat secara langsung morfologi koloni bakteri yang tumbuh. Hasil isolasi diperoleh masing-masing cawan 3 isolat bakteri asam laktat, sehingga jumlah bakteri asam laktat yang diisolasi yakni 12 isolat. Hasil pengamatan morfologi makroskopik 12 isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopik Bakteri

Kode Sampel	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi	Ukuran
T1a	Putih	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T1b	Krem	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T1c	Putih	Bulat	Rata	Cembung	Kecil
T2a	Krem	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T2b	Putih	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T2c	Putih	Bulat	Rata	Cembung	Kecil
T3a	Krem	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T3b	Krem	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T3c	Putih	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T4a	Putih	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T4b	Putih	Bulat	Rata	Datar	Kecil
T4c	Krem	Bulat	Rata	Datar	Kecil

Sumber: Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, 2019.

Keterangan: T= terasi, 1=pengenceran 10^{-1} , 2=pengenceran 10^{-2} , 3=pengenceran 10^{-3} , 4=pengenceran 10^{-4} , a,b,c=isolat ke-

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa bakteri tersebut memiliki karakteristik morfologi berwarna putih dan krem, berbentuk bulat, tepian yang rata, bentuk elevasi datar dan cembung, serta ukuran koloni kecil. Hal ini sesuai dengan penelitian Putri dan Endang (2018), koloni bakteri asam laktat secara makroskopis berbentuk *circular* dan *punctiform*, dengan elevasi *convex*, *flat*, dan *raised*. Tepi koloni bakteri berbentuk *entire* dan *undulate*. Bakteri memiliki ciri warna putih dan krem. Koloni bakteri ini memiliki zona bening yang tumbuh pada media MRSA. Isolat BAL akan tumbuh ketika diinkubasi pada suhu 37°C , koloni *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri putih mengkilat, terdapat zona bening disekitar koloni, ukuran koloni 0,5-2mm, berbentuk bulat dan tidak berserat.

Koloni yang memiliki ukuran besar kemungkinan berasal dari kelompok bakteri Gram positif. Hal ini dikaitkan dengan struktur dinding selnya. Menurut Pelezar & Chan (2008), bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal, yaitu 15-80nm, sehingga dapat menyebabkan strukturnya lebih padat dan memiliki ukuran yang besar. Adapun bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang tipis 10-15nm, sehingga strukturnya kurang padat dan ukuran menjadi lebih kecil.

Adanya warna pada bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor-faktor. Menurut Hidayat (2006), bentuk koloni bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Menurut Ilyas (2001), variasi bentuk bakteri yang terjadi juga dipengaruhi oleh lingkungan (faktor biotik dan abiotik), faktor makanan (medium tumbuh) dan suhu (minimum, optimum, dan maksimum).

Pada fermentasi produk perikanan yaitu *inasua*, diperoleh isolasi bakteri asam laktat pada medium MRSA sebanyak 4 isolat yang memiliki karakteristik koloni yang berbeda (Putri dan Endang, 2018). Dari sekian banyak isolat bakteri asam laktat yang tumbuh, beberapa koloni yang memiliki perbedaan bentuk dipilih untuk uji selanjutnya. Pada pedas terdapat 3, bekasam 7 isolat, terasi 4 isolat, dan rusip 5 isolat (Rinto, 2011). Terdapat 10 jenis isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari induk abalon yang merupakan kelompok bakteri gram positif dan berbentuk basil (Situmeang *et al.*, 2010).

4.2 Identifikasi Bakteri Terbaik (Biokimia)

4.2.1 Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram merupakan salah satu jenis identifikasi mikroorganisme yang biasa dilakukan. Uji pewarnaan gram terhadap isolat murni dilakukan di Laboratorium Kemanana Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Pengamatan bakteri dilakukan menggunakan mikroskop. Koloni yang diperoleh diamati morfologi sel, meliputi warna sel dan bentuk sel.



Tabel 2. Hasil pewarnaan bakteri

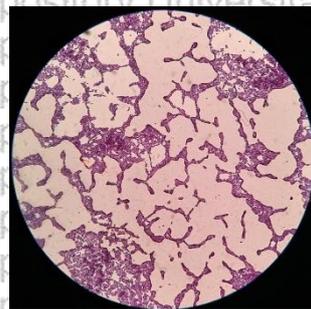
Kode Sampel	Bentuk Sel	Warna Gram
T1a	Bulat	Merah
T1b	Batang	Ungu
T1c	Bulat	Merah
T2a	Batang	Merah
T2b	Bulat	Merah
T2c	Batang	Merah
T3a	Batang	Ungu
T3b	Batang	Ungu
T3c	Bulat	Merah
T4a	Bulat	Ungu
T4b	Batang	Merah
T4c	Batang	Ungu

Sumber: Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, 2019.

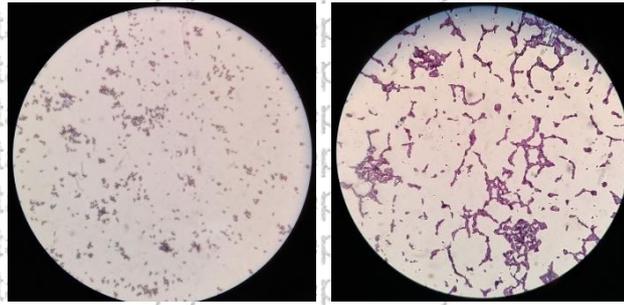
Berdasarkan pada Tabel 2 diketahui bahwa isolat bakteri yang diperoleh bersifat gram negatif dan gram positif. Bentuk sel dan pewarnaan gram bakteri dapat lihat pada Gambar 9.



(a)



(b)



(c)

(d)

Gambar 9. Hasil Pengamatan Morfologi Sel Bakteri

Pada penelitian ini, hasil pewarnaan Gram pada 12 sampel yang diteliti, 5 dari 12 sampel yaitu T1b, T3a, T3b, T4a, T4c merupakan bakteri Gram positif, yaitu ditandai dengan sel berwarna ungu setelah dilakukan pewarnaan Gram. Hal tersebut dikarenakan bakteri asam laktat memiliki kandungan lipid yang rendah, sehingga dinding sel lebih mudah terdehidrasi akibat perlakuan alkohol yang menyebabkan pori-pori sel menjadi lebih kecil dan permeabilitasnya berkurang sehingga zat warna *kristal violet* yang merupakan zat warna utama tidak dapat keluar dari sel (Hadioetomo, 1993).

Sedangkan 7 dari 12 sampel yaitu T1a, T1c, T2a, T2b, T2c, T3c, T4b merupakan bakteri Gram negatif, yaitu ditandai dengan sel berwarna merah setelah dilakukan pewarnaan gram. Hal tersebut dikarenakan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel dengan kandungan lipida yang tinggi, lipida larut oleh aseton alkohol sehingga kompleks zat warna kristal violet pada dinding sel tidak dapat dipertahankan dan mengikat zat warna merah safranin (Iay, 1994).

Sedangkan 4 dari 5 sampel yang berwarna ungu merupakan bakteri asam laktat dikarenakan berbentuk batang, dan merupakan Gram positif yaitu T1b, T3a, T3b, T4c. Hal ini sesuai dengan pernyataan Khalid (2011), BAL dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang, berwarna ungu dengan ciri warna koloni putih susu atau krem, koloni bundar, berukuran 0,5-1,2

x 0,5-1,5 μm . Teknik pewarnaan membagi bakteri berdasarkan perbedaan dasar dalam struktur dinding selnya. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel seperti jala yang tebal yang terbuat dari peptidoglikan (50-90% berat selubung sel), sedangkan bakteri gram negatif memiliki lapisan yang lebih tipis (10% berat selubung sel).

Bakteri asam laktat adalah bakteri yang menghasilkan asam laktat dari glukosa, termasuk bakteri Gram-positif, kokus yang tidak berspora atau membentuk spora, kokobasil atau batang. *Lactobacillus* merupakan BAL yang berbentuk batang, sedangkan *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* dan *Streptococcus* berbentuk kokus (Elliot *et al.*, 2013)

4.3 Uji Aktivitas Antibakteri

Pada uji aktivitas antibakteri, bakteri asam laktat yang diperoleh diuji kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri patogen yaitu *E. coli*. Pengukuran yang dilakukan dalam metode ini dengan cara menghitung total diameter yang terbentuk dikurangi diameter kertas cakram yang digunakan. Diameter kertas cakram yaitu sebesar 6 mm. Hasil zona hambat bakteri yang diperoleh dari isolat terasi terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil uji aktivitas antibakteri

Gambar 10 menunjukkan hasil positif dalam menghambat bakteri *E. coli*. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona bening yang terlihat disekitar kertas cakram yang telah diberi bakteri hasil isolasi dari terasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lay (1994) bahwa kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme. Zat antimikroba terlihat adanya wilayah bening sekitar kerta cakram.

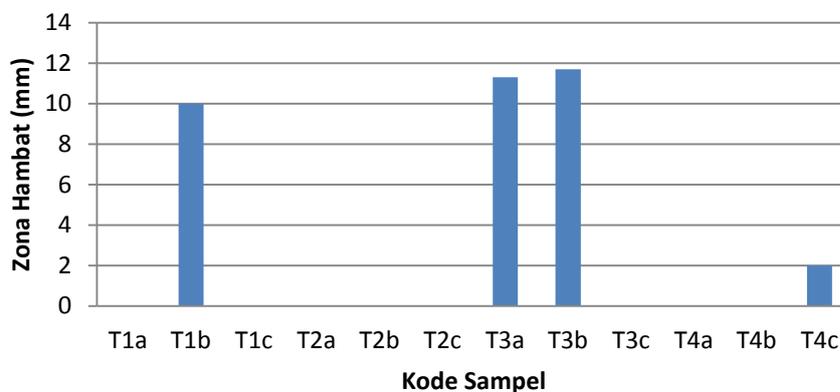
Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode Kirby-Bauer. Prinsip kerja metode Kirby Bauer adalah difusi sejumlah senyawa antibakteri ke media agar yang telah diinokulasikan dengan cara menggoreskan mikroba uji di atas permukaan agar (Parija, 2009).

Keunggulan metode difusi agar Kirby- Baeur yakni digunakan untuk menentukan sensitif dan resisten suatu antibiotika yang dapat dilihat dari zona hambatannya, sehingga dapat diketahui sensitifitas suatu bakteri.

Semakin besar diameter zona bening yang dihasilkan, semakin besar resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Namun, dalam metode ini masih diperlukan standar acuan baku untuk menentukan besaran sensitifitas antibakteri (Sacher dan Richard, 2002).

Grafik zona hambat bakteri isolat terasi terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 11.

Aktivitas Antibakteri



Gambar 11. Rata-rata zona hambat bakteri

Pada Gambar 9 menunjukkan bahwa setiap isolat menghasilkan zona hambat yang berbeda terhadap *E. coli*. Zona hambat paling besar yakni T3b, T3a, T1b, dan T4c masing-masing sebesar 11.7 mm, 11.3 mm, 10 mm dan 2 mm. Berdasarkan zona hambat yang terbentuk dapat dikategorikan bakteri yang diperoleh memiliki aktivitas antibakteri yang kecil. Menurut Indu *et al.* (2006), uji aktivitas kriteria tinggi apabila zona bening yang terbentuk > 16 mm, aktivitas sedang 12-16 mm dan aktivitas kecil bila zona bening yang terbentuk < 12 mm.

Zona hambat terbentuk karena adanya interaksi antara isolat bakteri asam laktat yang mendesak pertumbuhan *E. coli* dengan ditandai pembentukan zona jernih di sekitar koloni bakteri uji. Menurut Situmeang *et al.* (2017), bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat merusak komponen struktur dinding sel bakteri patogen. Adanya enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat mampu mendegradasi komponen dinding sel bakteri patogen.

Umumnya komponen antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Selain itu, bakteri asam laktat juga dapat berfungsi sebagai pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH dan mensekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme seperti H₂O₂, diasetil, CO₂, asetaldehid, disomer asam amino dan bakteriosin (Lawalata *et al.*, 2010).

Perbedaan kemampuan masing-masing isolat bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* mungkin disebabkan perbedaan jenis senyawa aktif yang dihasilkan. Beberapa hal yang mempengaruhi besar kecilnya zona hambat yang dibentuk oleh isolat bakteri asam laktat terhadap *E. coli* antara lain: interaksi antara kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan senyawa aktif atau enzim hidrolitik, umur biakan bakteri; jumlah senyawa aktif yang dihasilkan, komposisi medium dan waktu inkubasi. Penurunan zona hambat juga dapat terjadi karena isolat bakteri sudah masuk fase kematian disebabkan sumber nutrisi pada media terbatas (Dewi 2011).

Molekul antagonis yang diproduksi oleh BAL adalah bakteriosin yang merupakan peptida antimikroba atau protein yang diproduksi oleh strain beragam spesies bakteri. bakteriosin dapat diabsorpsi oleh reseptor yang terdapat pada permukaan sel bakteri dan masuk melalui dinding sel. Setelah molekul kontak dengan membran, menyebabkan membran sitoplasma menjadi tidak stabil. Akibatnya viabilitas sel menurun dan menyebabkan keluarnya material yang terdapat dalam inti sel, dan





mengakibatkan sel lisis. Aktivitas antimikroba ini secara alami menghambat pertumbuhan bakteri patogen serta bakteri pembusuk (Noopur *et al.*, 2010).

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memiliki efek bakterisida terhadap mikroorganisme lain. Bakteriosin dari BAL atau BAL yang menghasilkan bakteriosin secara umum dianggap aman untuk konsumsi manusia dan dapat diaplikasikan dalam pengawetan makanan.

Penggunaan bakteriosin dalam industri makanan dapat membantu untuk mengurangi penambahan pengawet kimia sama misalnya mengurangi intensitas perlakuan panas, dan pada akhirnya akan menghasilkan makanan yang lebih awet secara alami dan lebih kaya akan sifat-sifat organoleptik dan nutrisinya. Keawetan ini disebabkan BAL berkontribusi

dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen.

Hambatan ini karena BAL dapat memproduksi beberapa metabolit misalnya asam organik (asam laktat dan asetat), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin (Gálvez *et al.*, 2007).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah isolat bakteri asam laktat dari terasi udang memiliki potensi antibakterial untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Hasil pengenceran 10^1 , 10^2 , 10^3 , dan 10^4 , pada masing-masing cawan ditemukan yaitu 235 isolat, 215 isolat, 175 isolat dan 81 isolat. Isolat yang menghasilkan potensi antibakterial yaitu T1b, T3a, T3b dan T4c dengan keterangan: T=terasi, 1=pengenceran 10^1 , 3=pengenceran 10^3 , 4=pengenceran 10^4 , a,b,c=isolat ke-. Bahwasanya dapat disimpulkan bahwa produk terasi udang dari Tuban Jawa Timur berpotensi menghasilkan antibakterial alami.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah untuk melakukan uji tambahan untuk lebih menspesifikan spesies bakteri asam laktat penghasil antibakterial dari terasi udang

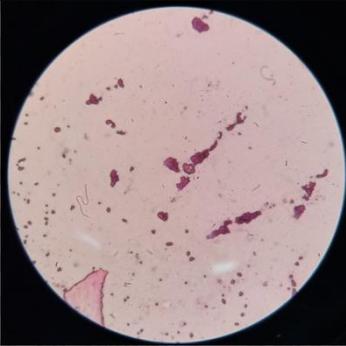
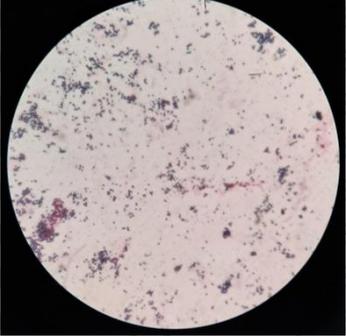
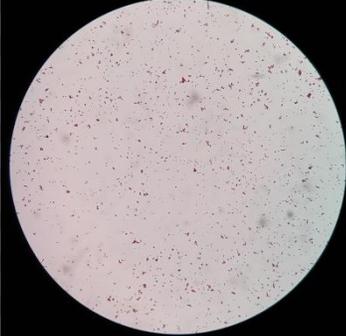
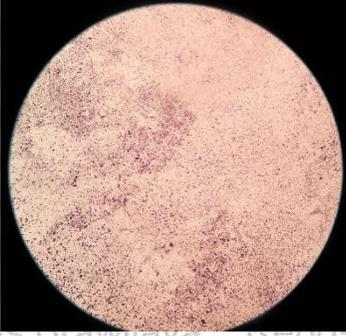


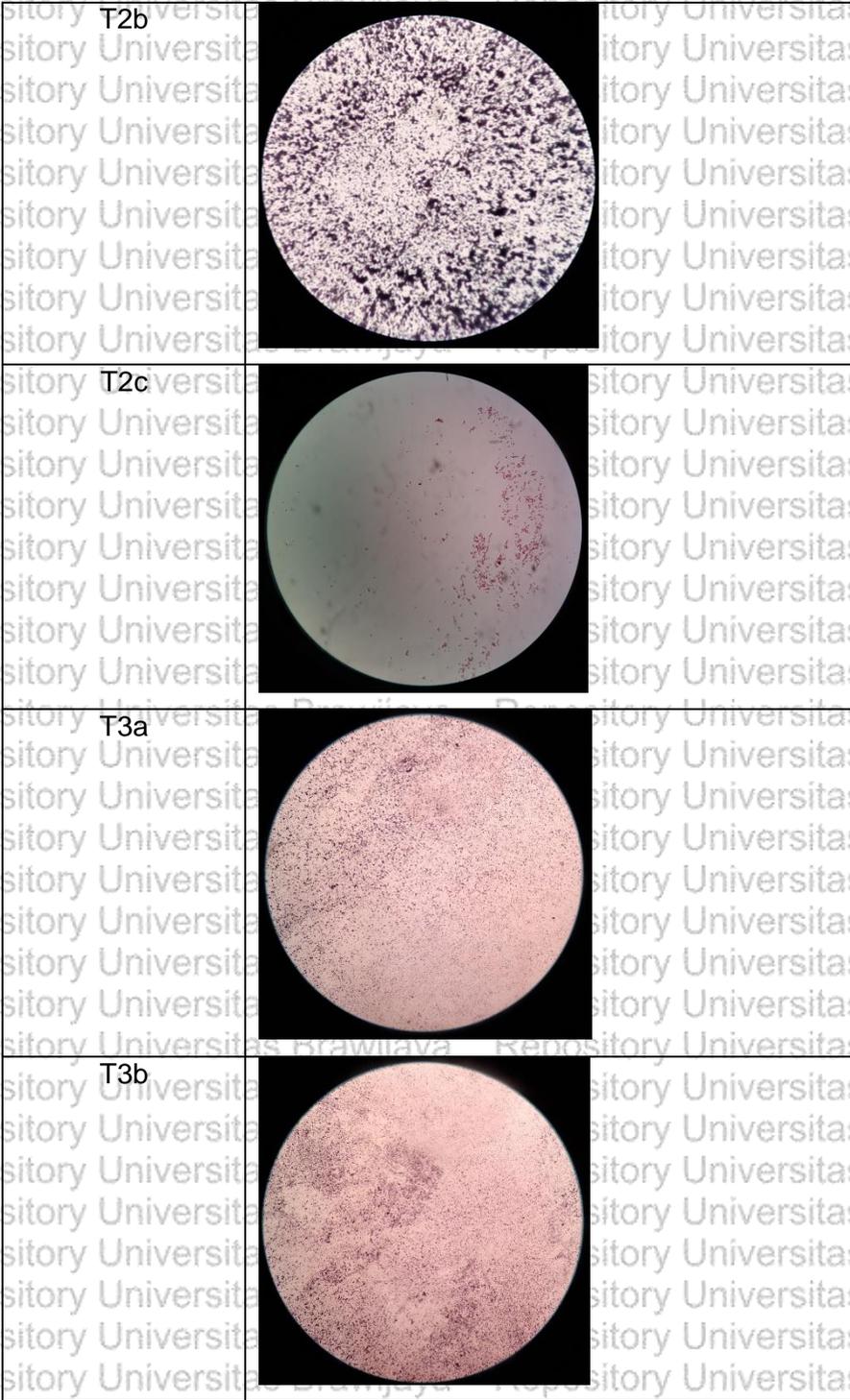
DAFTAR PUSTAKA

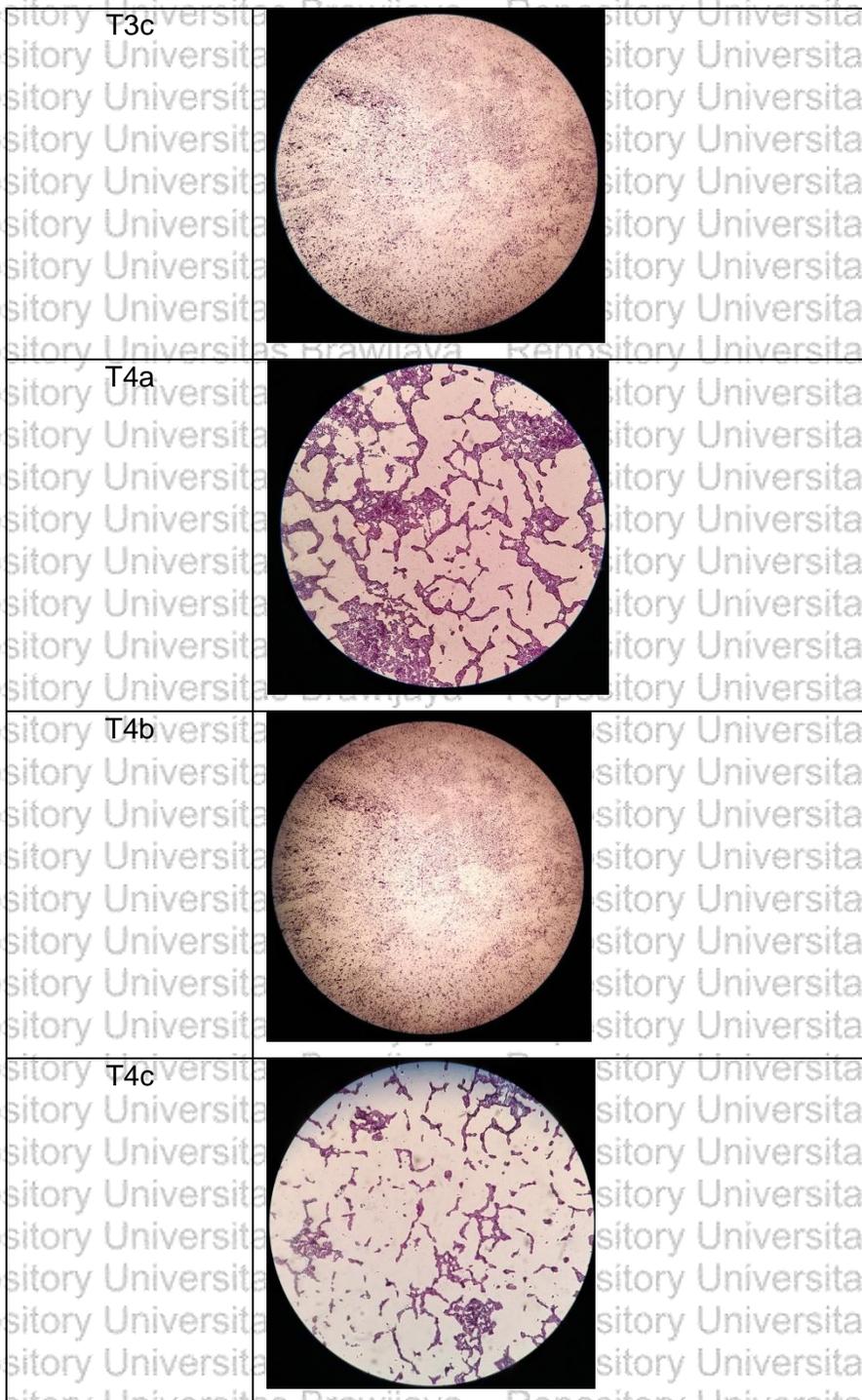
- Albertus, Sandjaja dan Heriyanto. 2006. Metode Penelitian. Jakarta: Prestasi Pustaka.
- Alokomi, H.L., E. Skytta, and M. Saarela. 2000. Lactid acid permeabilizes gram negative bacteria by disrupting outer membran. *Appl and Environ Microbiol.* **66** (5): 2001-2005.
- Ammor, S., G. Tauveron., E. Dufour., and I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactid acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-screening and characterization of the antibacterial compound. *Food Control* **17**: 454-461.
- Aryanta, I. W. R. 2007. Peranan bakteri asam laktat dalam industri pengolahan bahan pangan. *Dalam: Proseding orasi ilmiah guru besar. Badan penjaminan mutu. Universitas Udayana. Denpasar.*
- Axelsson L., and Ray. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Terjemahan. Salminen S., Wright AV., Ouwehand A., 3rd edition, *revised and expended.* Marcel Dekker, Inc, New York.
- Barbosa, M.T. 2005. Applied and environmental microbiology: Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *American Society for Microbiology.* **71** (2): 968-978.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from acid lactic bacteria for use as food preservative. *Food Technology.* **43**:164-167.
- Desniar., D. Poernomo, dan W. Wijatur. 2009. Pengaruh Konsentrasi Garam pada Peda ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*) dengan Fermentasi Spontan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan indonesia.* **7**(1)
- Elliot T., Whorthington, dan O. Gill. 2013. Mikrobiologi Kedokteran dan Infeksi. Jakarta: EGC. 171 hlm.
- Fardiaz S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Galvez, A., H. L.R. Abriouel., and Lopez. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology.* **120**: 51-70.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan presedur dasar laboratorium. Penerbit Gramedia, Jakarta
- Hardiningsih R., R. Napitupulu., and Y. Yulinery. 2005. Isolasi dan uji resistensi beberapa isolat *Lactobacillus* pada pH rendah. *Jurnal Biodiversitas.* **7**(1): 15-17.



Lampiran 1. Hasil Pewarnaan Gram Menggunakan Mikroskop dengan Pembesaran 100x

Kode Sampel	Hasil Pewarnaan Gram
T1a	
T1b	
T1c	
T2a	





Keterangan: T= terasi. 1=pengenceran 10^1 . 2=pengenceran 10^2 . 3=pengenceran 10^3 . 4=pengenceran 10^4 . a,b,c=isolat ke-



Lampiran 2. Pengenceran

Keterangan

Gambar Hasil Pengenceran

Pengenceran 10^{-1}





Pengenceran 10^{-2}



Pengenceran 10^{-3}





Pengenceran 10⁻⁴

