

# SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL BAKTERIOSIN DARI DAGING DAN PRODUK OLAHANNYA

(SCREENING OF BACTERIOCIN PRODUCER LACTIC ACID BACTERIA FROM MEAT AND ITS PRODUCTS)

E.S. Rahayu<sup>1</sup>, A.K. Wardani<sup>2</sup>, dan S. Margino<sup>3</sup>

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) which naturally occur in meat and meat products have been isolated and screened for their ability to produce bacteriocin. The objective of this research was to obtain the potential bacteriocin producer of lactic acid bacteria which could be used as food bio-preservative. Source of lactic acid bacteria used in this study were beef, chicken flesh, 'vacuum packaged' sausage and sliced meat obtained from traditional market or department store. Ten grams of each samples was put onto five different enrichment media, i.e., TGE (tryptone-glucose-yeast extract) pH 5 plus 3% NaCl; MRS (deMan Rogose Sharpe) pH 5,5; TGE broth pH 5,5; TGE buffer broth pH 5,5; and TGE broth plus Tween 80 & 1% Nazida pH 6,0, incubated for 24-72 hours to stimulate the growth of lactic acid bacteria.

Different enrichment media were used to stimulate the growth of strains belong to each genus, since the nutritional and environmental requirement for optimum growth were suggested to be genera-dependent. Screening of LAB bacteriocin producer was carried out by dilution - pour plate methods (culture from each enrichment medium) followed by overlay using the indicator strains. Indicator strains used in this study were *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Pediococcus acidilactici* LB-42, *Leuconostoc mesenteroides* LY, and *Enterococcus faecalis* MI. Colonies showing growth inhibition to indicator (indicated by clear zone) were isolated and purified. Isolates were then characterized based on Gram, catalase, shape and arrangement of cell, type of fermentation, effect of temperature to the growth and acid production from several carbon sources.

From the primary screening (dilution - pour plate - overlay), 30 strains belong to *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Enterococcus* which suspected to produce antimicrobial substance were obtained. However, based on the confirmation test (diffusion method), only three (3) strains were identified to produce bacteriocin, i.e. *Leuconostoc mesenteroides* SM 22, SM 32, and SM 46.

In this study, *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 was selected for food application. Bacteriocin of *Leuconostoc mesenteroides* SM-22 was able to inhibit the growth of psychrophilic bacteria naturally occur in meat and shrimp kept at refrigerator. Microbial population of raw meat with the initial number of about  $3 \times 10^4$  CFU/g decreased one log cycle after treated with bacteriocin, and this number maintained less than  $10^5$  CFU/g after storage raw meat at refrigerator for five days. On the other side, microbial population of raw meat with no bacteriocin treatment increased to  $10^6$  CFU/g after 4 days kept at refrigerator. In the case of shrimp, washing raw shrimp with cold water could reduce the population of bacteria about one log cycle, followed treatment with bacteriocin, this population

increased very slowly and still less than  $10^5$  CFU/g after 5 days storage at refrigerator. While without any treatment, microbial population of raw shrimp which initially about  $3 \times 10^5$  CFU/g rapidly increased to  $10^6$  CFU/g after 3 days. This data showed that *Leuconostoc mesenteroides* SM-22 was a potential bacteriocin producer and can be applied as bio-preservative for cold storage food.

**Keywords :** Bakteri Asam Laktat, Daging, Bacteriosin

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) telah digunakan selama berabad-abad untuk fermentasi dan pengawetan makanan, contohnya daging, susu dan sayuran dan pada umumnya bakteri ini tergolong aman (*generally recognized as safe* - GRAS). Bakteri ini menghasilkan berbagai produk metabolisme yang penting termasuk asam organik, komponen flavor, dan berbagai anti mikrobia khususnya bakteriosin. Klaenhammer 1988, mendeskripsikan sifat-sifat umum yang terdapat pada bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu sensitif terhadap protease, stabil terhadap panas, bakterisidal dengan spektrum penghambatan yang sempit. Walaupun beberapa bakteriosin (nisin, pediosin dan nakasin) yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat memiliki spektrum yang luas yaitu mampu menghambat bakteri Gram negatif (Kalchayanand, dkk., 1992; Steven dkk., 1991). Berdasarkan sifat-sifat menguntungkan yang dimiliki oleh bakteriosin, khususnya yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, maka komponen ini memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan pengawet makanan (Daeschel, 1989; Delves-Broughton, 1990). Nisin merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* yang telah mendapat status GRAS (FDA, 1988) dan telah banyak digunakan sebagai pengawet untuk berbagai jenis makanan (Delves-Broughton, 1990).

Rahayu dkk., 1996 telah melakukan isolasi bakteri asam laktat dari berbagai makanan fermentasi asal Indonesia dan seleksi terhadap kemampuannya untuk menghasilkan komponen antibakteri. Dari 28 isolat yang diperoleh yang selanjutnya diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum-pentosus*, 2 isolat diantaranya diperkirakan memproduksi agensia antibakteri yang mampu memperpanjang fase lag pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang digunakan sebagai indikator, dengan menggunakan metode turbidimetri. Pada penelitian saat itu juga telah digunakan metode difusi agar untuk skrining bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri, namun diduga karena rendahnya aktifitas antibakteri yang dihasilkan, metoda ini tidak dapat diterapkan. Bakteri asam laktat penghasil bakteriosin juga telah banyak diisolasi dari daging dan produk olahannya (Schillinger dan Lucke, 1989; Ahn dan Stiles, 1990; Lewus dkk, 1991)

1 Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada (Kontak Person)

2 Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

3 Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Tujuan dari penelitian bakteri ini adalah isolasi bakteri asam laktat yang berasal dari daging dan produk olahannya. Diduga bahwa bakteri asam laktat yang berasal dari daging dan olahannya memiliki potensi sebagai penghasil bakteriosin yang lebih besar daripada bakteri asam laktat yang berasal dari makanan fermentasi. Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk isolasi dan skrining bakteri asam laktat penghasil antibakteri berbeda berbeda dengan metode sebelumnya (Rahayu dkk., 1996). Kalau pada penelitian sebelumnya digunakan metode turbidimetri, maka pada penelitian ini digunakan metode difusi agar. Pada penelitian ini juga digunakan 5 jenis media untuk menstimulasi pertumbuhan masing-masing genus bakteri asam laktat. Pada penelitian ini juga dilakukan aplikasi bakteriosin dari bakteri asam laktat yang terpilih untuk memperpanjang masa simpan daging dan udang segar yang disimpan dingin.

## MATERIAL DAN METODA

### Sample daging dan olahannya

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging sapi dan ayam mentah dibeli di pasar Beringharjo, Yogyakarta. Sosis daging sapi & ayam dan daging iris (*sliced meat*) dalam kemasan vakum dan penyimpanan dingin dibeli di supermarket Super Ekonomi dan Hero, Yogyakarta.

### Bakteri indikator

Bakteri indikator yang digunakan untuk uji aktivitas bakteriosin adalah *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Pediococcus acidilactici* LB 24, *Leuconostoc mesenteroides* LY, dan *Enterococcus faecalis* MI, yang diperoleh dari Prof. Bibek Ray (University of Wyoming, USA)

### Persiapan sample dan pertumbuhan awal BAL

Sampel (sosis dan daging iris) dalam kemasan disimpan dalam refrigerator sampai terlihat tanda-tanda kerusakan yaitu timbulnya gas atau keluarnya cairan. Timbulnya gas dan cairan diperkirakan didominasi oleh BAL. Untuk daging sapi dan ayam mentah langsung dilakukan isolasi.

Pertumbuhan awal bakteri asam laktat dilakukan sebagai berikut : Sampel (10 gram) tanpa penghancuran dimasukkan ke dalam 5 jenis media cair (100 ml), selanjutnya diinkubasi selama 1-2 hari. Tujuan digunakan 5 jenis media (Ray, 1997 komunikasi langsung) adalah untuk menstimulasi pertumbuhan masing-masing bakteri asam laktat. Untuk mendapatkan strain *Pediococcus* digunakan media cair TGE pH 5,0 plus 3% NaCl, inkubasi dilakukan pada suhu 45°C. Untuk *Lactobacillus* digunakan media cair MRS pH 5,5 inkubasi pada suhu 25-30°C. Untuk *Leuconostoc* digunakan media cair TGE pH 5,5 inkubasi pada suhu rendah (5-10°C). Untuk mendapatkan *Lactococcus* digunakan media cair TGE buffer yaitu TGE tanpa Tween 80 tetapi ditambah 0,2% Na-sitrat, 0,2% Na-asetat, 0,2% Na-fosfat, pH 5,5 inkubasi dilakukan pada suhu 25°C. Untuk *Enterococcus* digunakan media cair TGE tanpa Tween 80 ditambah 0,1% Na-azida, pH 6,0 inkubasi dilakukan pada suhu 40°C. Komposisi media cair TGE adalah 0,5% glukosa; 0,5% yeast ekstrak; 0,5% tripton;

0,1% Tween 80; 0,005% MnSO<sub>4</sub>; 0,005% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O pH 6,5. Untuk membuat TGE keras dilakukan penambahan agar 1,5%, sedangkan untuk membuat TGE lunak penambahan agar sebesar 0,75%.

### Isolasi BAL penghasil antimikrobia (penjelasan langsung dari Prof. Bibek Ray)

Isolasi bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan metode *pour plate* yang sekaligus dilapisi (*overlay*) dengan bakteri indikator untuk skrining BAL yang mampu menghasilkan antibakteri. Kultur media cair (dari pertumbuhan awal) umur 1-2 hari diencerkan sampai dengan 10<sup>-7</sup>, dari pengenceran 10<sup>-5</sup>. 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> diambil 100 µl diletakkan dalam cawan Petri, selanjutnya dituangi dengan TGE padat (yang masih mencair dengan suhu sekitar 50°C). Setelah agar memadat di atasnya dilapisi lagi dengan TGE padat, caranya dengan menuangi media yang masih mencair. Selanjutnya dilakukan inkubasi 1-2 hari sampai muncul koloni-koloni BAL di bawah permukaan agar.

Untuk tujuan skrining isolat BAL yang mampu menghasilkan antibakteri, dilakukan *overlay* pada masing-masing Petri dengan bakteri indikator. Caranya diambil 5 µl kultur bakteri indikator umur sehari (keempat spesies digunakan semua, setiap cawan Petri digunakan satu spesies bakteri indikator) dimasukkan dalam TGE agar lunak (*soft agar*) yang masih mencair, suhu 50°C, divortek dan kemudian dituang di permukaan media yang telah ditumbuhi berbagai jenis koloni bakteri, sehingga dapat terdeteksi penghambatan bakteri indikator ini oleh bakteri yang berasal dari sampel.

Skrining dilakukan pada koloni yang memberikan zona jernih yang berarti terjadi penghambatan terhadap bakteri indikator. Koloni ini selanjutnya dipindahkan ke media padat TGE, untuk selanjutnya dimurnikan dan diidentifikasi.

### Identifikasi BAL

Identifikasi isolat BAL dilakukan dengan cara konvensional yang didasarkan pada karakteristik morfologi, uji biokimiawi, uji fisiologi, dan tipe fermentasi (Rahayu, 2003).

### Penyimpanan isolat BAL dan preparasi kultur stok

Kultur BAL yang diperoleh disimpan pada suhu beku atau dengan liofiliasi. Penyimpanan dengan suhu beku caranya demikian : Kultur BAL (5 ml) umur 1 hari disentrifugasi untuk mendapatkan massa sel. Setelah massa sel dicuci beberapa kali dengan aquades steril selanjutnya dimasukkan ke dalam campuran gliserol (20%) dan milk (10%) steril, perbandingan 1:1 (disiapkan dalam *cryotubes*). Selanjutnya disimpan dalam suhu beku (-20 atau -80°C). Stock yang akan digunakan disiapkan dengan menumbuhkan BAL pada media cair TGE.

### Skrining awal BAL penghasil bakteri

Skrining awal BAL penghasil antibakteri dilakukan sebagai berikut : Setelah agar TGE padat dilapisi dengan agar lunak yang telah diinokulasi bakteri indikator, dimasukkan dalam refrigerator selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan inokulasi dengan isolat yang diuji. Inokulasi dilakukan dengan ose jarum yang ditusukan pada agar.

Dengan cara demikian, maka satu cawan dapat digunakan untuk menguji sekaligus 8-10 isolat BAL. Setelah diinokulasi dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Isolat yang memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri indikator akan memberikan zona jernih disekitar koloni.

#### **Konfirmasi BAL penghasil bakteriosin dan uji aktifitas antibakteri**

Cara yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut : 5 ml medium TGE agar keras (50 °C) dituangkan dalam cawan Petri dan dibiarkan memadat, kemudian TGE agar lunak yang telah diinokulasi dengan 5 µl bakteri indikator umur 24 jam (jumlahnya sekitar  $10^5 - 10^6$ ) dituangkan di atasnya dan selanjutnya didiamkan pada suhu 4 °C selama 1 jam. Lima µl 'supernatan' bakteri asam laktat (umur 24 jam) yang telah diencerkan dalam berbagai level pengenceran diteteskan pada permukaan medium TGE agar yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator (ujung tip dimasukkan sedikit ke bawah permukaan agar).

'Supernatan' diperoleh dengan melakukan sentrifugasi kultur cair umur 24 jam (15.000xg, 15menit) untuk memisahkan dengan massa sel, selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit dengan tujuan untuk membunuh sel yang tersisa dan menghilangkan aktivitas proteolitik. Serial pengenceran (10x, 20x, 30x, dst) ditujukan untuk mengetahui besarnya aktivitas penghambatan. Setelah supernatan diteteskan pada permukaan medium TGE agar, selanjutnya didiamkan terlebih dahulu pada suhu 4°C selama 1 jam dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Aktivitas penghambatan dinyatakan dengan *arbitrary units* (AU/ml), yaitu diperoleh dengan pengenceran tertinggi supernatan yang masih menunjukkan adanya aktivitas penghambatan (zona jernih yang jelas). Misalnya pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan zona jernih adalah 50x, maka besarnya aktivitas adalah  $1000\text{ml}/5 \mu\text{l} \times 50 = 10.000 \text{ AU/ml}$  (Biswas dkk., 1991).

#### **Konfirmasi terhadap bakteriosin yang dihasilkan**

Uji konfirmasi terhadap bakteriosin yang dilakukan adalah uji stabilitas terhadap suhu tinggi dan terhadap enzim proteolitik. Diperkirakan bahwa bakteriosin yang berupa peptida, stabil terhadap panas tetapi tidak stabil terhadap aktivitas proteolitik. Untuk uji stabilitas terhadap terhadap suhu tinggi dilakukan dengan memanaskan 'supernatan' pada (a) suhu 100 °C, selama 30 menit, (b) 121 °C, 5 menit, dan (c) 121 °C, 15 menit. Supernatan selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya menggunakan bakteri indikator.

Uji stabilitas bakteriosin terhadap enzim proteolitik dilakukan dengan cara melarutkan enzim proteolitik (ficin, papain, protease type XIV dan XXIV) dalam 4 mM buffer fosfat pH 7,0 pada konsentrasi 10 µg/ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 1 jam, setelah selesai inkubasi diuji aktivitas antibakterinya.

#### **Produksi bakteriosin untuk aplikasi**

Isolat yang digunakan untuk aplikasi pada daging dan udang segar disimpan dingin pada penelitian ini adalah *Leuconostoc mesenteroides* SM-22 (hasil isolasi) dan *Pediococcus acidilactici* F-11 (referensi penghasil

bakteriosin). Untuk produksi bakteriosin digunakan media TGE cair (1000 ml) dalam fermentor, inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 18-20 jam dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Ekstraksi bakteriosin dilakukan dengan metoda adsorpsi-desorpsi (Yang, dkk, 1992). Setelah fermentasi selesai, pH kultur diatur menjadi 6 (menggunakan NaOH), dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 100 °C selama 15 menit untuk membunuh sel produser dan inkubasi pada suhu 4 °C selama 1 jam untuk proses desorpsi molekul bakteriosin ke dalam sel. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel (yang telah menyerap bakteriosin) dengan cara sentrifugasi. Massa sel selanjutnya dilarutkan pada NaCl 100mM (pH 1,5) selama semalam. Setelah selesai inkubasi, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sel (yang telah membebaskan bakteriosin) dengan supernatan yang membawa bakteriosin. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas bakteriosin.

#### **Aplikasi bakteriosin pada daging segar**

Daging segar yang diperoleh dari tempat penyembelihan dipotong berbentuk kubus (2x2x2 cm) dan dicelupkan dalam masing-masing larutan bakteriosin (konsentrasi 2000 AU/ml) dari *Leuconostoc mesenteroides* SM-22 (hasil isolasi) dan *Pediococcus acidilactici* F-11 (referensi BAL penghasil bakteriosin). Irisan daging selanjutnya disimpan dalam suhu dingin (refrigerator) selama 5 hari. Daging yang tidak dicelup dalam larutan bakteriosin dan langsung disimpan dalam larutan dingin digunakan sebagai kontrol. Enumerasi total bakteri dilakukan setiap hari.

#### **Aplikasi bakteriosin pada udang segar**

Udang segar (dibeli dipasar) dicuci dengan air dingin dan direndam dalam masing-masing larutan bakteriosin SM-22 dan F-11 (konsentrasi 2000 AU/ml) selama 1 jam pada suhu 4 °C, selanjutnya disimpan dalam suhu dingin (refrigerator) selama 6 hari. Udang yang tidak dicuci dan direndam dalam larutan bakteriosin dan langsung disimpan dalam larutan dingin digunakan sebagai kontrol. Enumerasi total bakteri dilakukan setiap hari.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Bakteri asam laktat dari berbagai produk daging**

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dengan metode *overlay* bakteri indikator dapat digunakan secara langsung untuk memilih isolat yang memiliki potensi menghasilkan agensia antibakteri yang ditandai dengan timbulnya zona jernih di sekitar koloni. Metode ini berbeda dengan yang telah dilakukan oleh Rahayu dkk., 1996 yang melakukan isolasi BAL penghasil agensia antibakteri secara tidak langsung. Bakteri asam laktat diisolasi terlebih dahulu dari makanan hasil fermentasi, selanjutnya dilakukan uji penghambatan terhadap bakteri indikator. Metode langsung pada penelitian ini lebih cepat di dalam menentukan isolat BAL yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri.

Pada penelitian ini, setelah sampel (sumber BAL) diinkubasi pada berbagai macam media cair dilanjutkan dengan *dilution-plating* dengan metode *pour plate*. Media berisi sampel yang telah ditumbuhi BAL (setelah diencerkan sampai dengan  $10^{-7}$ ), diambil 100 ul dan

dicampur dengan media TGE agar dalam cawan Petri. Lapisan pertama ini kemudian ditutup dengan lapisan media TGE agar. Setelah inkubasi pada kondisi yang sesuai, kemudian dipilih cawan Petri dengan pertumbuhan koloni yang tidak terlalu banyak untuk pengujian lebih lanjut. Untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari setiap koloni yang tumbuh maka dilakukan *overlay* bakteri indikator dalam media TGE agar lunak. Agar lunak digunakan dalam *overlay* supaya difusi zat antibakteri dapat berlangsung dengan mudah dan dapat memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri indikator. Sebelum inkubasi pada suhu 30°C dilakukan inkubasi pada suhu dingin yang bertujuan untuk memberikan kesempatan pada komponen antibakteri terdifusi pada agar lunak sebelum bakteri indikator mulai tumbuh. Pada inkubasi suhu 30°C komponen antibakteri telah terdifusi pada agar lunak sehingga dapat memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri indikator. Bila tidak dilakukan pendinginan maka diperkirakan bakteri indikator tumbuh sebelum terjadi difusi antibakteri yang efektif pada agar lunak.

Bakteri indikator yang digunakan pada penelitian ini ada 4 yaitu *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, *Pediococcus acidilactici* LB 24, *Leuconostoc mesenteroides* LY, dan *Enterococcus faecalis* MI yang diperoleh dari Prof. Dr. Bibek Ray. Dengan menggunakan 4 indikator dari berbagai genera BAL, skrining dapat difokuskan terhadap BAL penghasil bakteriosin. Bakteriosin merupakan antibakteri polipeptida dengan spektrum yang sempit, dalam hal ini adalah daya hambatnya terhadap kelompok BAL yang lain. Tidak seperti pada penelitian terdahulu (Rahayu, dkk., 1996) sampel yang digunakan sebagai sumber bakteri asam laktat adalah makanan hasil fermentasi dengan indikator *Staphylococcus aureus*.

Walaupun BAL dikenal memproduksi beberapa komponen antibakteri (asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, bakteriosin), namun pada penelitian ini skrining lebih ditekankan pada BAL penghasil bakteriosin sehingga digunakan bakteri indikator yang tahan asam agar dapat diketahui bahwa penghambatan yang terjadi bukan karena asam. Bakteriosin dapat membunuh bakteri yang secara taksonomi mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat (Daeschel, 1992). Pada penelitian ini digunakan 4 indikator yang berasal dari 4 genera BAL yang berbeda.

Terdapatnya aktivitas antibakteri dapat diketahui setelah inkubasi 1 hari yaitu dengan timbulnya zona jernih di sekitar koloni yang tumbuh di media lapisan bawah. Zona jernih yang ditimbulkan bervariasi, ada yang sangat jelas dengan pinggiran yang sangat tegas namun ada pula yang kabur (Gambar 1). Koloni BAL penghasil bakteriosin ditentukan apabila zona jernih yang dihasilkan memiliki pinggiran yang jelas. Hal ini dapat dimengerti karena bakteriosin yang bersifat bakteriosidal akan terdifusi ke sekitarnya dengan kecepatan yang sama dan kemudian membunuh bakteri indikator. Lingkaran dengan tepi yang jelas menunjukkan sejauh mana difusi komponen ini berlangsung, dan akibat dari terdifusinya komponen ini bakteri indikator tidak tumbuh. Sedangkan asam atau komponen antibakteri yang lain yang hanya bersifat bakteriostatik akan memberikan pinggiran lingkaran yang kabur, karena (sebagian) bakteri indikator yang tidak mati akan tetap hidup walaupun sangat lambat.

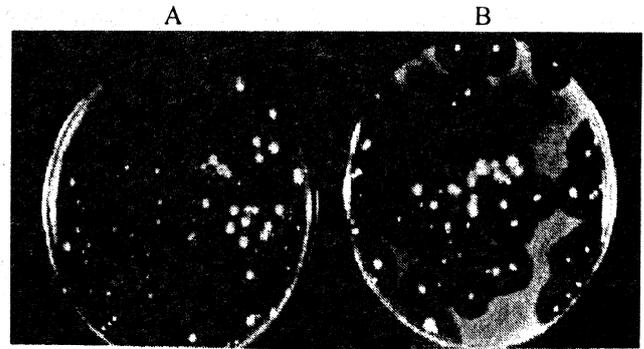


Figure 1. Colonies surrounded by clear zone, Petri A with light clear zone and Petri B with sharp, wide clear zone.

Koloni yang memberikan zona jernih disekitarnya (baik dengan pinggiran yang tegas atau yang kabur) selanjutnya diisolasi dan dimurnikan. Isolat BAL yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi dan dikonfirmasi kemampuan memproduksi bakteriosin.

Skrining awal untuk mendeteksi BAL penghasil antibakteri dilakukan dengan menumbuhkan bakteri indikator (*pour plate*), yang selanjutnya diinokulasi (dititik dengan jarum ose) dengan isolat BAL yang akan diuji. Apabila isolat BAL ini menghasilkan antibakteri maka disekitar koloninya akan muncul zona jernih, sebagai akibat dari terhambatnya bakteri indikator. Pada penelitian ini diperoleh 30 isolat BAL dari berbagai sumber yang diperkirakan sebagai penghasil antibakteri. Pada paper ini hasil identifikasi hanya disajikan sampai dengan level genera (kecuali untuk strain yang berpotensi sebagai penghasil bakteriosin), mengikuti diagram identifikasi awal seperti disajikan pada Gambar 2. Hasil identifikasi disajikan bersama-sama dengan uji aktivitas antibakteri, yang disajikan pada Tabel 1.

#### Pengaruh media isolasi

Pada penelitian, sebelum isolasi, sampel (sumber BAL) ditempatkan terlebih dahulu masing-masing pada 5 jenis media, dan diinkubasi selama 1-2 hari. Tujuan dari penggunaan 5 media yang berbeda ini adalah untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri tertentu (yang diharapkan) di setiap media. Dari kelima macam media isolasi yang digunakan tidak semua menghasilkan isolat seperti yang diharapkan.

Media cair TGE pH 5 ditambah 5% NaCl dimaksudkan untuk mendapatkan isolat *Pediococcus*, tetapi tidak diperoleh isolat *Pediococcus*, namun diperoleh isolat *Streptococcus*. Pada umumnya *Pediococcus* tumbuh pada suhu 25-40 °C, bahkan sampai di atas 45°C, kadar garam di atas 5% dan pada pH 4. Setelah inkubasi 2 hari pada suhu 45°C, pH media berubah menjadi 4,2. Ada kemungkinan dalam media tersebut terdapat *Pediococcus* tetapi tidak menghasilkan substansi antibakteri sehingga tidak terisolasi dengan media *overlay* bakteri indikator (atau tidak menampakkan zona jernih disekitar koloni). Bakteri yang terisolasi pada media ini adalah dari genus *Streptococcus* karena sifatnya yang lebih toleran terhadap panas dan kadar garam tinggi dibandingkan dengan genera lain.

Media kedua yaitu media cair MRS pH 5,5 dimaksudkan untuk mendapatkan isolat *Lactobacillus*. Media ini berhasil menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus*

yang membutuhkan nutrisi kompleks. Media MRS digunakan karena kandungan nutrisinya lebih kompleks dari pada TGE. Setelah inkubasi 1-2 hari pada suhu 25-30 °C, pH media berubah menjadi 4,0. Pada suasana ini *Lactobacillus* masih dapat tumbuh karena termasuk bakteri tahan asam.

Media cair TGE pH 5,5 bertujuan untuk mendapatkan *Leuconostoc*. Perbedaan perlakuan dengan media TGE yang lain adalah pada suhu inkubasi inkubasi yaitu 5-10°C. Setelah inkubasi pH media berubah menjadi 4,8. *Leuconostoc* merupakan bakteri yang dapat tumbuh pada suhu rendah atau refrigerator. Pada media ini *Leuconostoc* dapat terisolasi tetapi ada genus lain yang juga ikut terisolasi yaitu *Lactobacillus*. Hal ini dikarenakan *Lactobacillus* mampu tumbuh pada suhu rendah.

Untuk mendapatkan *Lactococcus* digunakan media cair TGE buffer karena *Lactococcus* tumbuh baik pada pH sekitar 5. Yang membedakan media ini dengan TGE cair yaitu tidak digunakannya Tween 80 tetapi ditambah 0,2% Na-sitrat, 0,2% Na-asetat dan 0,2% Na-fosfat sebagai buffer. Setelah inkubasi 1-3 hari pada suhu 25°C pH berubah menjadi 4,8. Dari media ini hanya didapatkan genus *Streptococcus*. Ada kemungkinan *Lactococcus* tidak terisolasi karena memang populasinya sangat kecil pada sampel atau terdapat *Lactococcus* pada sampel, tetapi tidak menghasilkan antibakteri sehingga tidak terisolasi.

Isolat *Enterococcus* juga tidak didapatkan dengan menginkubasi sampel di dalam media TGE *broth* tanpa Tween 80 tetapi ditambah 0,1% Na-azida pH 6,0 tetapi pada kondisi ini dihasilkan isolat *Streptococcus* dan *Lactobacillus*. Penambahan Na-azida bertujuan untuk mencegah tumbuhnya mikrobia aerob karena Na-azida dapat mengikat oksigen terlarut sehingga menciptakan suasana anaerob.

Penggunaan bermacam-macam media belum dapat menghasilkan isolat seperti yang diharapkan, namun demikian penggunaan berbagai jenis media ini dapat diperoleh berbagai jenis bakteri asam laktat.

### Konfirmasi BAL penghasil bakteriosin

Pada skrining awal seperti disajikan pada Table 1, nampak bahwa seluruh isolat mempunyai potensi sebagai penghasil antibakteri. Namun uji selanjutnya menggunakan supernatan yang telah dinetralkan ternyata hanya beberapa isolat saja yang terdeteksi sebagai penghasil bakteriosin. Metode yang digunakan untuk menghitung aktivitas antibakteri adalah metode pengenceran (*critical dilution method*) yang bertujuan untuk mengetahui sampai seberapa besar penghambatan bakteriosin terhadap bakteri indikator yaitu *Pediococcus acidilactici* LB 42. Pada penelitian ini diperoleh isolat yang berpotensi sebagai penghasil bakteriosin yaitu SM-2, SM-32, SM-46, demikian pula isolat referensi BR-1 dan BR-8. Dari hasil identifikasi lanjutan (pembentukan asam dari berbagai sumber karbon) diperoleh hasil bahwa SM-22, SM-32 dan SM-46 diduga adalah *Leuconostoc mesenteroides*.

Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa pada umumnya strain BAL penghasil bakteriosin yang terisolasi adalah dari genera *Leuconostoc* dan *Enterococcus*, yang berasal dari daging iris kemas vakum. Hal ini dapat dimengerti karena sebelum diisolasi, sampel sebagai sumber

BAL disimpan terlebih dahulu sehingga terlihat tanda-tanda kerusakan seperti munculnya gas, yang merupakan tanda-tanda pertumbuhan *Leuconostoc*. Penyimpanan suhu rendah juga menstimulasi pertumbuhan strain BAL dari kedua genera ini.

### Konfirmasi bakteriosin yang dihasilkan

Pada penelitian ini, untuk konfirmasi terhadap komponen antibakteri dilakukan uji stabilitas panas dan aktivitas terhadap enzim proteolitik, seperti dikemukakan oleh beberapa peneliti (Klaenhammer 1988, Eckner, 1992, Ray, 1992, Bhunia, dkk., 1988) bahwa bakteriosin merupakan peptida pendek yang stabil terhadap panas. Dugaan lain bahwa adanya kandungan asam amino tertentu yaitu sistein yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh pemanasan. Pada penelitian ini, uji lanjutan terhadap komponen antibakteri dilakukan terhadap SM-22, SM-32 dan SM-46. Ketiga antibakteri yang diuji tetap memiliki aktivitas setelah pemanasan. Saat ketiga komponen ini diperlakukan dengan enzim proteolitik, ternyata aktivitas antibakterinya hilang, sehingga diduga komponen antibakteri yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* SM-22, 32, dan 46 adalah bakteriosin.

### Aplikasi bakteriosin pada daging segar simpan dingin

Pada penelitian ini telah dilakukan aplikasi bakteriosin SM-22 dan F-11 sebagai pengawet daging yang disimpan dalam refrigerator, yang hasilnya disajikan pada Gambar 3A. Dari hasil menunjukkan bahwa populasi mikrobia pada daging segar adalah sekitar  $10^5$  CFU/g. Daging segar yang sebelum disimpan dalam refrigerator dicelupkan terlebih dahulu pada larutan bakteriosin SM-22 dan F-11 (2000 AU/ml), populasi bakterinya dapat diturunkan satu log cycle menjadi sekitar  $3 \times 10^4$  CFU/g. Dengan jumlah populasi awal yang lebih rendah maka peningkatan populasi bakteri juga lebih lambat dibandingkan dengan daging segar yang langsung disimpan di dalam refrigerator, sehingga diharapkan masa simpan daging dapat diperpanjang. Gambar 3 menunjukkan bahwa populasi bakteri pada daging segar yang disimpan pada suhu dingin meningkat dengan cepat dan pada hari ketiga jumlah telah mencapai  $10^6$  CFU/g, dengan kondisi fisik seperti bau dan warna yang tidak disukai. Sedangkan pada daging yang direndam terlebih dahulu dengan bakteriosin SM-22 maupun F-11 sebelum disimpan, populasinya meningkat dengan sangat lambat dan sampai dengan hari ke-5, jumlah masih di bawah  $10^5$  CFU/ml. Dari hasil ini terlihat bahwa bakteriosin SM-22 dan F-11 mampu membunuh dan menekan bakteri yang terdapat pada daging segar, dan dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri pada daging yang disimpan pada suhu dingin.

### Aplikasi bakteriosin pada udang segar simpan dingin

Pada penelitian ini juga digunakan aplikasi bakteriosin SM-22 dan F-11 sebagai pengawet udang segar yang disimpan dingin, yang hasilnya disajikan pada Gambar 3B. Dari hasil menunjukkan bahwa populasi mikrobia pada udang segar adalah sekitar  $3 \times 10^5$  CFU/g. Udang segar yang sebelum disimpan di dalam refrigerator dicuci dengan air es dan direndam terlebih dahulu pada larutan bakteriosin SM-22 dan F-11 (2000 AU/ml), populasi bakterinya dapat

diturunkan satu log cycle menjadi sekitar  $3-5 \times 10^4$  CFU/g. Gambar 3B menunjukkan bahwa populasi mikrobia pada udang segar yang tidak dicuci dan direndam dalam bakteriosin meningkat dengan cepat dan pada hari ke 4 sudah melebihi  $10^6$  CFU/g, sedangkan udang yang terlebih dahulu dicuci dengan air es sebelum disimpan pada hari pertama dan kedua populasinya masih dapat ditekan, namun demikian setelah hari ketiga populasinya menyamai udang yang tanpa cuci bahkan pada hari ke 4 sudah mencapai  $10^6$  CFU/g. Populasi mikrobia pada udang segar yang diperlakukan dengan bakteriosin dapat ditekan bahkan sampai dengan hari ke 4 populasinya masih sekitar  $10^5$  CFU/g. Namun demikian kesegaran udang tentu saja juga menjadi pertimbangan di dalam penyimpanan udang terlalu lama di suhu rendah. Dari hasil ini nampak bahwa bakteriosin yang dihasilkan dari bakteri asam laktat dapat digunakan untuk memperpanjang masa simpan udang segar yang disimpan dingin.

## KESIMPULAN

Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai penghasil bakteriosin dapat diisolasi dari produk olahan daging. Pada penelitian ini diperoleh 3 isolat *Leuconostoc mesenteroides* yaitu SM-22, SM-32, dan SM-36 yang berpotensi sebagai penghasil bakteriosin yang dapat dikembangkan sebagai agensia pengawet makanan. Bakteriosin dari SM-22 dapat memperpanjang masa simpan daging dan udang segar yang disimpan dingin.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dana penelitian ini berasal dari Proyek Hibah Tim Pascasarjana Batch 1 (1996-1998). Ucapan terima kasih diberikan kepada Prof. Bibek Ray, Universitas Wyoming, USA yang telah menerima para peneliti untuk bekerja di Lab.nya pada kesempatan yang berbeda-beda, dan atas supervisi yang diberikan serta bantuan isolat indikator. Ucapan terima kasih juga disampaikan pada Aisyah dan Renny, yang terlibat di dalam penelitian ini.

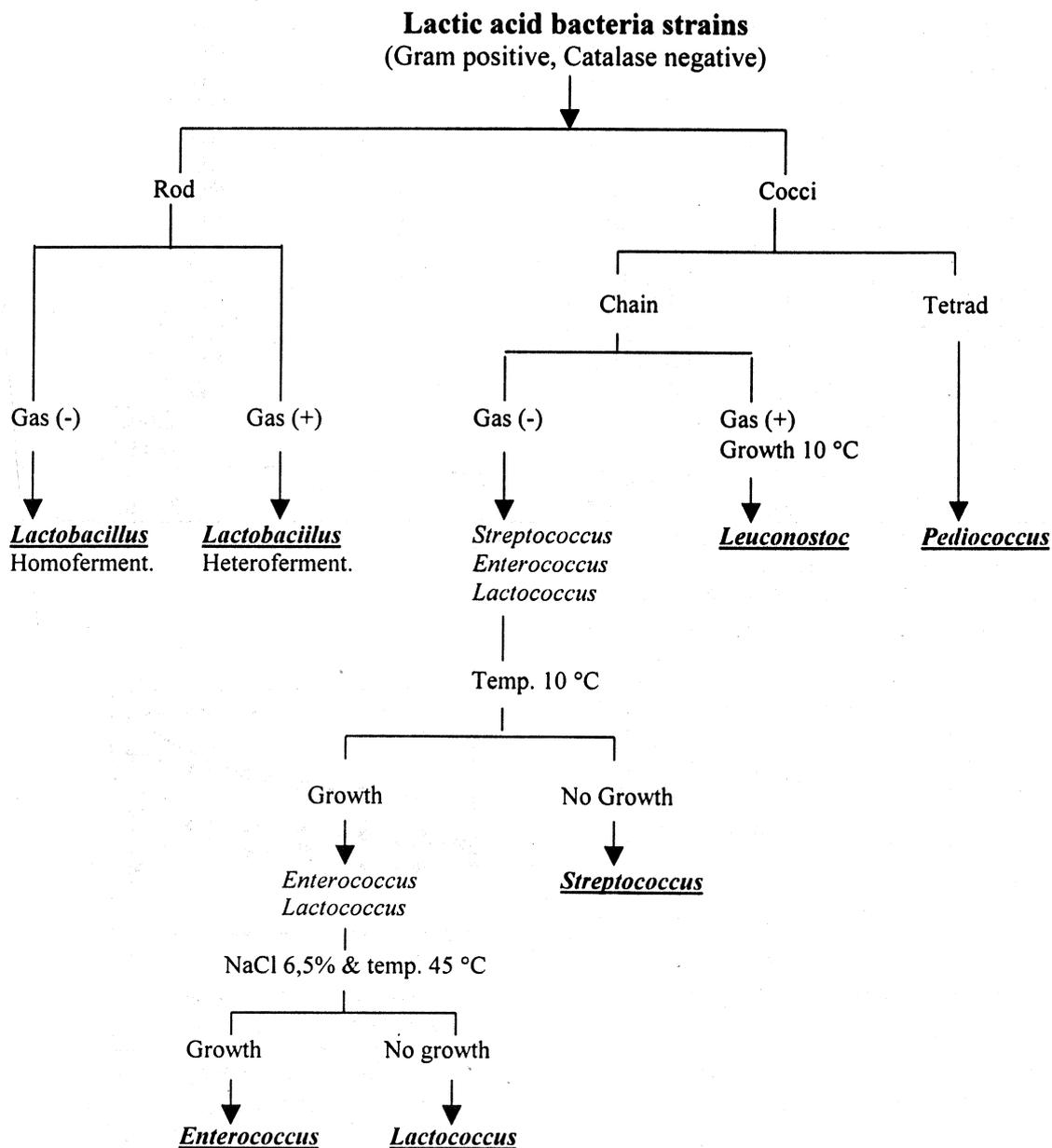


Figure 2. Scheme of lactic acid bacteria identification into genera level

**Table 1. Isolation, identification and antimicrobial activity of LAB strains**

No	No. isolat	Genus Suspected	Source	Antimicrobial activity	Bacteriocin (AU/ml)***
1	SM-22	<i>Leuconostoc</i> *	Sliced meat vac.pack.	++	1.000
2	SM-25	<i>Leuconostoc</i>	Sliced meat vac.pack.	+	200
3	SM-26	<i>Leuconostoc</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
4	SM-28	<i>Leuconostoc</i>	Sliced meat vac.pack.	+	ND
5	SM-32	<i>Leuconostoc</i> *	Sliced meat vac.pack.	++	6.000
6	SM-46	<i>Leuconostoc</i> *	Sliced meat vac.pack.	++	10.000
7	ESR-1	<i>Enterococcus</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
8	ESR-2	<i>Enterococcus</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
9	ESR-3	<i>Enterococcus</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
10	ESR-9	<i>Enterococcus</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
11	ESR-11	<i>Enterococcus</i>	Sliced meat vac.pack.	++	200
12	AIS-1	<i>Sterptococcus</i>	Beef	+	ND
13	AIS-2	<i>Sterptococcus</i>	Beef	+	ND
14	AIS-3	<i>Sterptococcus</i>	Flesh chicken	+	ND
15	AIS-4	<i>Lactobacillus</i>	Beef sausage	+	ND
16	AIS-5	<i>Sterptococcus</i>	Beef sausage	+	ND
17	AIS-6	<i>Sterptococcus</i>	Beef sausage	+	ND
18	AIS-7	<i>Lactobacillus</i>	Beef sausage	+	ND
19	AIS-8	<i>Sterptococcus</i>	Beef sausage	+	ND
20	AIS-9	<i>Lactobacillus</i>	Beef sausage	+	ND
21	AIS-10	<i>Sterptococcus</i>	Beef	+	ND
22	AIS-11	<i>Lactobacillus</i>	Flesh chicken	+	ND
23	AIS-12	<i>Sterptococcus</i>	Flesh chicken	+	ND
24	AIS-13	<i>Lactobacillus</i>	Chiken sausage	+	ND
25	AIS-14	<i>Lactobacillus</i>	Chiken sausage	+	ND
26	AIS-15	<i>Leuconostoc</i>	Chiken sausage	+	ND
27	AIS-16	<i>Lactobacillus</i>	Chiken sausage	+	ND
28	AIS-17	<i>Lactobacillus</i>	Chiken sausage	+	ND
29	AIS-18	<i>Lactobacillus</i>	Chiken sausage	+	ND
30	BR-1	<i>Leuconostoc</i>	Reference**	++	2.000
31	BR-8	<i>Lactoccus</i>	Reference**	++	18.000
32	BR706	<i>Lactobacillus</i>	Reference**	++	200
33	PAF-11	<i>Pediococcus</i>	Reference**	+++	24.000

+ Clear zona with un-clear edge; ++ Clear zone with sharp edge

\*Identified as *Leuconostoc mesenteroides*

\*\*Strains obtained from Prof. Bibek Ray (sebagai referensi)

\*\*\* *Pediococcus acidilactici* LB 42 used as indicator

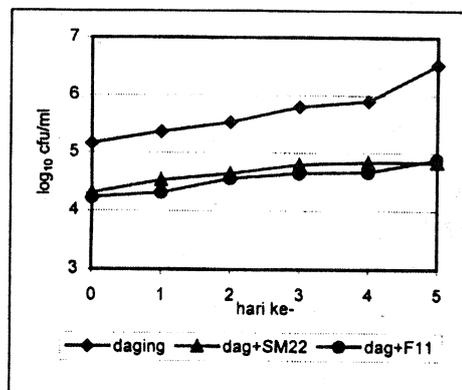


Fig 3A. Effect of bacteriosin SM-22 and F-11 to the growth of microorganisms occur naturally in beef kept at refrigerator

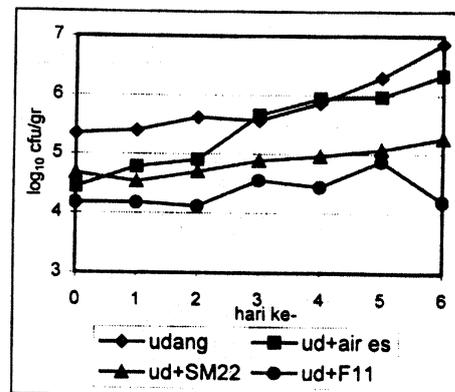


Fig 3B. Effect of bacteriosin SM-22 and F-11 to the growth of microorganisms occur naturally in shrimp kept at refrigerator

## REFERENSI

- Ahn, C., and Stiles, M.E. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* 69 : 302 – 310.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. of Appl. Bacteriol.* 65 : 261-268.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4) 1265-1267.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technol* 43 (1) 164-167.
- Daeschel, M.A. 1992. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Dalam Ray, B. dan Daeschel, M. (Eds). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press. London.
- Delves-Broghton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 40 : 100, 102, 104, 106, 108, 111, 112, 117
- Eckner, K.F. 1992. Bacteriocins and food applications. *Dairy, Food and Environ. Sanitation.* 12 : 204-209.
- FDA (Federal Register), 1988. Nisin preparation : Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Food and Drug Admin., Federal Register*, April 6, 1988. Code of Federal Regulation, Chapter 21 (21CFR) Part 184. 53 : 11247-11251.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., and Ray, B. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lts. Appl. Microbiol.* 15:239-243.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., and Montville, T.J. 1991. Inhibition of food-borne pathogen by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1683-1688.
- Rahayu, E.S. 2003. Lactic acid bacteria in fermented foods of Indonesian origin. *Agritech* 23 (2) : 75-84.
- Rahayu, E.S., Djaafar, T.F., Wibowo, D., and Sudarmadji, S. 1996. Lactic acid bacteria from indigenous fermented foods and their antimicrobial activity. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 1996, 3 (2) : 21- 28
- Ray, B. 1992. Pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici* as a Food Biopreservative. Dalam Ray, B. dan Daeschel, M. (Eds). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press. London.
- Schillinger, U., and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1901 – 1906.
- Steven, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3613-3615.
- Yang, R., Johnson, M.C., and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:3355-3359