

## KARAKTERISASI AWAL BAKTERIOSIN PRODUKSI BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI DARI *PLIEK U*

### THE PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM *PLIEK U*

Nurliana<sup>1</sup>, Suzanna Rabfiani<sup>1</sup> dan M. Hanafiah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Kesmavet, <sup>2</sup>Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Darussalam Banda Aceh.  
Telp. (0651) 51977, Pes. 4178

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati ciri-ciri senyawa aktif yang terkandung dalam supernatan bakteri asam laktat yang diisolasi dari *pliek u* akibat penambahan enzim proteolitik dan pemanasan. Pengujian ulang aktivitas hambatan dan uji sensitivitas supernatan isolat PBI (bakteri asam laktat) yang diduga mengandung bakteriosin menggunakan metode *pour plate* (*overlay* dan metoda sumur). Media untuk menumbuhkan isolat PBI digunakan MRS broth dimodifikasi dengan penambahan tween 80 dan *yeast extract*, dan juga menggunakan media agar MRS. Media untuk bakteri indikator (*Listeria monocytogenes*) menggunakan agar BHI 0.75 %. Pengaruh enzim pepsin dan tripsin konsentrasi 1 mg/ml setelah dicampur dengan supernatan isolat PBI (v/v) diuji terhadap sensitivitas bakteriosin. Uji sensitivitas terhadap pemanasan dilakukan pada suhu 60,80,100 dan 120°C selama 10 dan 12 menit, Data dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa supernatan isolat BAL PBI diduga mengeluarkan senyawa bioaktif (bakteriosin), karena mampu menghambat *L. Monocytogenes* dengan aktivitas hambatan sebesar 3 mm, dan juga sensitif terhadap pepsin dan tripsin, serta tidak sensitif pada pemanasan 60,80°C selama 10 dan 15 menit, tetapi sensitif pada pemanasan 100°C dan 120°C.

**Kata kunci:** karakterisasi, bakteri asam laktat, bakteriosin.

#### ABSTRACT

The purpose of this research was to examine the characteristic of active-compound(s) in the supernatant of lactic acid bacteria isolated from *pliek u* after heating and addition of proteolytic enzyme (s). A re-test on the inhibition activity and sensitivity of PBI supernatant isolate predicted to contain bacteriocin used a pour plate method (*overlay* and punch hole methods). The PBI isolate was isolated MRS broth medium modified by the addition of tween 80 and yeast extract, the BHI of 0,75 % was used for bacteria indicator (*L. Monocytogenes*). The effects of pepsin and trypsin on the concentration of 1 mg/ml to the bacteriocin sensitivity were tested after mixing an equal amount of the supernatant of PBI isolate. The sensitivity test the heat was conducted at the temperatures of 60,80,100 and 120°C for 10 and 15 minutes. Data obtained were analysed descriptively. The result showed that the supernatant of lactic acid bacteria PBI was predicted to bioactive compound (bacteriocin), because it was able to inhibit *L. monocytogenes* with inhibition activity of 3 mm and was also sensitive to pepsin and trypsin. However it was not sensitive to the heating at 60 and 80°C for 10 and 15 minutes, but sensitive to the heating at 100°C and 120°C.

**Keywords:** Characterization, lactic acid bacteria, bacteriocin

## PENDAHULUAN

*Pliek u* merupakan salah satu makanan fermentasi tradisional yang berasal dari daerah Aceh. Makanan fermentasi ini diawetkan tanpa penambahan kultur starter atau terfermentasi secara spontan (tanpa disengaja). Berdasarkan penelitian terdahulu telah diisolasi bakteri asam laktat dari *pliek u*, kemungkinan fermentasi pada bahan makanan ini disebabkan oleh bakteri tersebut.

Selama proses fermentasi berlangsung, bakteri asam laktat menghasilkan metabolit yang akan menimbulkan perubahan rasa dan bentuk, serta dapat menghambat bakteri perusak dan patogen (Ray, 1992 dan Holzapfel *et al.*, 1995). Metabolit tersebut terdiri dari asam-asam organik, diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin (Barefoot and Nettles, 1993 dan Nettles dan Barefoot, 1993).

Bakteriosin adalah molekul protein yang menghambat pertumbuhan bakteri sensitif, terutama bakteri gram positif terutama yang erat hubungannya dengan penghasil bakteriosin (Garver dan Muriana, 1993 dan Giraffa, 1995). Sebahagian besar bakteri tidak aktif oleh enzim-enzim protease, stabil pada pemanasan 100-120°C dan penyimpanan, khususnya pada pH rendah, tetapi tidak efektif terhadap bakteri gram negatif (Barefoot dan Klaenhammer, 1983 Buchanan dan Klawitter, 1992<sup>b</sup>, Liao *et al.*, 1994, Vlaemynk *et al.*, 1994 dan Coventry *et al.*, 1995).

Penelitian ini berkaitan dengan usaha untuk mendapatkan bahan pengawet biologi alami yang dihasilkan bakteri asam laktat sebagai isolat murni asal Indonesia melalui pengamatan sifat-sifat senyawa bioaktif yang diduga bakteriosin akibat pemanasan dan penambahan enzim proteolitik.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesmavet FKH Unsyiah Darussalam Banda Aceh dengan menggunakan supernatan isolat bakteri asam laktat PBI yang diisolasi dari *pliek u*. Pada tahap pengujian ulang aktivitas supernatan PBI digunakan media modifikasi MRS broth yang dicampur dengan tween 80 dan yeast extract, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan semalam tersebut disentrifus pada pemusingan 4000 rpm selama 40 menit untuk mendapatkan supernatan, lalu diuji aktivitas hambatan terhadap *L. monocytogenes* 10<sup>6</sup>/ml dengan menggunakan metode sumur. Selain itu uji ini diperkuat dengan metode *pour plate*, yaitu biakan semalam tersebut sebanyak 10<sup>6</sup>/ml dalam agar MRS

dan overlay *L. monocytogenes*. Tahap ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali berturut-turut. Aktivitas hambatan ditandai dengan zona bening disekitar sumur dan koloni isolat PBI.

Pengujian supernatan isolat PBI terhadap enzim proteolitik (pepsin dan tripsin, MERCK) dengan konsentrasi 1 mg/ml, yaitu 1 mg enzim ditambahkan larutan buffer 7 (J.T. Baker) sebanyak 1 ml, kemudian dicampur dengan supernatan v/v. Selanjutnya uji sensitivitas dilakukan menggunakan metode sumur untuk melihat kemampuannya menghambat indikator bakteri. Positif apabila tidak mampu menghambat *L. monocytogenes*.

Pengujian kestabilan supernatan isolat PBI dilakukan dengan memanaskan supernatan dalam *waterbath* pada suhu 60<sup>o</sup>, 80<sup>o</sup>, 100<sup>o</sup>, dan 120<sup>o</sup>C selama 10 dan 15 menit. Selanjutnya diuji menggunakan metode sumur, kestabilan pada pemanasan ditandai zona bening pada sumur. Hasil yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pengujian ulang aktivitas hambatan isolat PBI memperlihatkan kemampuannya menghambat pertumbuhan *L. monocytogenes*. Hal tersebut juga didukung oleh kemampuan supernatan isolat PBI untuk menghambat *L. monocytogenes* yang menghasilkan zona hambatan sebesar 3mm. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian Nielsen *et al.*, (1990); Buchanan dan Klawitter (1992<sup>a</sup>, 1992<sup>b</sup>) efektifitas dari metabolit yang dihasilkan oleh BAL umumnya mampu menghambat pertumbuhan *L. monocytogenes*. Menurut Stecchini *et al.* (1992) antibakteri dari BAL efektif terhadap BAL lain atau bakteri yang mempunyai hubungan kekerabatan dengan penghasil anti bakteri.

Apabila dibandingkan antara metode *pour plate* secara *overlay* dengan metode sumur terlihat adanya perbedaan, dimana cara yang pertama zona hambatan terlihat luas, tetapi pada cara yang kedua hanya 3 mm. Penggunaan metode yang pertama menguji langsung koloni, kemungkinan aktivitas hambatan dapat terjadi selama bakteri tumbuh dan berkembangbiak yang sekaligus dapat menghasilkan beberapa senyawa anti mikroba. Bakteri asam laktat umumnya menghasilkan asam laktat dari pemecahan glukosa sehingga pH media menjadi rendah dan menghambat pertumbuhan bakteri lain (Tagg *et al.* 1976). Selain itu dapat juga disebabkan penggabungan

antara beberapa senyawa anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *L. Monocytogenes*.

Penggunaan metode kedua disebabkan karena supernatan isolat PB1 sudah mengalami beberapa proses seperti sentrifugasi dan netralisasi, sehingga pengaruh beberapa metabolit seperti asam-asam organik dan hidrogen peroksida dapat dihindari. Mekanisme kerja bakteri asam laktat terhadap bakteri sensitif dapat bersifat bakteriostatik dan bakterisida, seperti hidrogen peroksida, asam-asam organik dan bakteriosin (Piard dan Desmazeaud, 1991).

pada suhu tertentu (Kozak *et al.*, 1978; Joegler dan Klaenhammer, 1986; Kojic *et al.*, 1991; Juven *et al.*, 1992). Walaupun zona hambatan pada kontrol dapat diperlihatkan lebih kecil dibandingkan bakteriosin yang telah ditemukan oleh peneliti lain, tetapi hal tersebut telah membuktikan bahwa kemungkinan isolat bakteri asam laktat PB1 dapat menghasilkan senyawa aktif yang disebut dengan bakteriosin.

Berdasarkan uji kestabilan terhadap pemanasan ternyata supernatan isolat PB1 hanya stabil pada pemanasan 60°C dan 80°C baik selama 10

Tabel 1. Pengaruh penambahan enzim proteolitik (Pepsin dan Tripsin) dan pemanasan terhadap sensitivitas senyawa aktif isolat PB1

Perlakuan	Diameter Zona Hambatan <i>L. monocytogenes</i> (mm)
Kontrol (supernatan + larutan Buffer pH 7)	3
Pepsin (1 mg/ml larutan Buffer pH 7)	0
Tripsin (1 mg/ml larutan Buffer pH 7)	0
60°C selama 10 menit	3
80°C selama 10 menit	3
100°C selama 10 menit	0
120°C selama 10 menit	0
60°C selama 15 menit	3
80°C selama 15 menit	2
100°C selama 15 menit	0
120°C selama 15 menit	0

Perbedaan hambatan mungkin dapat dipengaruhi oleh fase pertumbuhan *L. Monocytogenes*. Menurut Parente dan Hill (1992), hambatan yang disebabkan oleh bakteriosin tidak terjadi pada fase log tetapi terjadi pada fase stationer *L. Monocytogenes*.

Pengaruh penambahan enzim proteolitik pepsin dan tripsin terhadap supernatan PB1 memperlihatkan tidak ada zona hambatan disekitar lubang sumur atau dengan kata lain supernatan PB1 tersebut sensitif terhadap pepsin dan tripsin setelah dilakukan tiga kali ulangan (Tabel 1). Hal ini mungkin disebabkan oleh kerja pepsin dan tripsin yang menghidrolisis protein dalam supernatan PB1. Aktivitas pepsin dan tripsin jika dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya zona hambatan pertumbuhan *L. monocytogenes* sebesar 3 mm.

Untuk membuktikan bahwa bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin dapat dilakukan dengan menambahkan beberapa enzim proteolitik seperti protease, pepsin, tripsin,  $\alpha$ -chymotripsin. Pronase K subtilisin, proteinase, ficin, serta dengan pemanasan

maupun maupun 15 menit terlihat masih ada aktivitas hambatan sebesar 3 mm. Sedangkan pada pemanasan 100 dan 120°C selama 10 dan 15 menit tidak ada aktivitas hambatan sama sekali.

Apabila dihubungkan antara pemanasan dengan berat molekul protein dalam supernatan menunjukkan jelas bahwa protein dengan berat molekul besar tidak tahan panas. Senyawa aktif tersebut lebih cenderung dimasukkan ke dalam golongan protein yang mempunyai berat molekul besar, karena agak tahan terhadap pemanasan. Oleh sebab itu senyawa aktif yang terdapat dalam supernatan isolat bakteri asam laktat PB1 dapat digolongkan sebagai bakteriosin.

Isolat BAL PB1 menghasilkan senyawa bioaktif (bakteriosin) yang mempunyai aktivitas hambatan terhadap *L. Monocytogenes* sebesar 3 mm, sensitif terhadap pepsin dan tripsin, serta stabil pada pemanasan 60-80° C selama 10 dan 15 menit.

Agar bakteriosin ini diaplikasikan, maka perlu dilakukan pencirian bakteriosin lebih lanjut,

memurnikan bakteriosin dan pengujian aplikasi secara langsung pada beberapa makanan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Barefoot, S.F. and T. R. Klaenhammer, 1983. Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 1808-1815.
- Barefoot, S.F. and C.G. Nettles, 1993. Antibiotics revisited: Bacteriocins Produced by Dairy Starter Cultures. *J. Dairy Sci.* 76: 2366-2379.
- Buchanan, R.L. and L. A. Klawitter, 1992a. Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK 5 for Controlling the Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in Refrigerated Foods. *J. Food Safety.* 12:219-236.
- Buchanan, R.L. and L. A. Klawitter, 1992b. Characterization of a lactic Acid Bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK 5, with Activity Against *Listeria monocytogenes* at Refrigeration Temperature. *J. Food Safety.* 12: 199-217.
- Conventry, M.J., K. Muirhead and M.W. Hickey, 1995. Partial Characterization of Pediocin PO2 and Comparison with Nisin for Biopreservative of Meat Products. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 133-145.
- Garver, K. I. and P. M. Muriana, 1993. Detection, Identification and Characterization of Bacteriosin-Producing Lactic acid Bacteria from Retail Food Products. *Int. J. Food Mikrobiol.* 12: 241-254.
- Giraffa, G., 1995. Enterococcal Bacteriocins : Their Potensial as Anti *Listeria* Factors in Dairy Technology. *Food Microbiol.* 12: 291-299.
- Holzapfel, W. H., R. Geisen and U. Schillinger, 1995. Biological Preservation of Food with reference to protective Cultures, Bacteriocins and Food-Grade Enzyms. *Int. J. Food mikrobiol.* 24;343-362.
- Joerger. M. C. And T. R. Klaenhammer, 1986. Characterization and Purification of Helveticin J an Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin produced by *lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 8: 439-448.
- Juven, B. J., F. Schved and P. Lindner, 1992. Antagonistic Compounds produced by Chicken Intestinal Strain of *lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protect.* (55) 3 : 157-161.
- Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina and L. Topisirovic, 1991. Bacteriocin-Producing Strain of *Lactococcus lactis* subsp. *Diacetilactis* S 50. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 6: 1835-1837.
- Kozak, W., J. Bardowski and W. T. Dorbrzanski, 1978. Lactostrepcins-Acid Bacteriocins Produced by Lactic Streptococci. *J. Dairy Research.* 45: 247- 257.
- Liao, Chii-Cheng, A. E. Yousef, G. W. Chism, and E. R. Richter, 1994. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in Buffer, Culture Media and Foods by Lacidin A, a bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU 133. *J. Food Safety.* 14 : 87-101.
- Nettles, C. G. and S. F. Barefoot, 1993. Biochemical and Genetic Characteristic of Bacteriocins of Food associated Lactic Acid Bacteria *J. Food Protection.* (56) 4: 338-356.
- Nielsen, J.W., J. S. Dickson, and J. D. Crouse, 1990. Use of a Bacteriocin by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* Associated With Fresh Meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 7 : 211442-2145.
- Parente, E. and C. Hill, 1992. Inhibition of *Listeria* in Buffer, Broth and Milk by Enterococin 1146, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus Faecium*. *J. Food Protect.* (55) 7: 503-508.
- Piard, J. C. and M. Desmazeaud, 1991. Inhibiting Faktors Produced by Lactic acid Bacteria. 1. Oxygen Metabolites and Catabolism End - Products. ( Review ) *Lait.* 71: 525-541.

Ray, B., 1992. Bacteriocins of Stater Culture Bacteria as Food Biopreservatives; an Overview, 177-206. In; B. Ray and M. Daeschel (ed). Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press, Boca Raton.

Stecchini, M. L., V. Aquaili, I. Sarais And A. Pitotti, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactococcus Lactis ssp lactis* Isolated From Italian Raw Ham. *J. Food Safety*. 12; 295-302.

Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannaker, 1976. Bacteriocins of Gram Positive Bacteria *Bacteriological Rev.* 11: 722-756.

Vlaemynck, G., L. Herman and K. Coudijzer, 1994. Isolation and Characterization of Two Bacteriocins Produced by *Enterococcus Faecium* strains Inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 211-225.