

**PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN LAMA FERMENTASI  
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG  
DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**SUSANTI ANUGRAH RIZKI**  
NIM. 13630004



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2018**

**PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN LAMA FERMENTASI  
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG  
DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
SUSANTI ANUGRAH RIZKI  
NIM. 13630004**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2018**

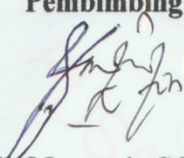
**PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN LAMA FERMENTASI  
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG  
DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum***

**SKRIPSI**

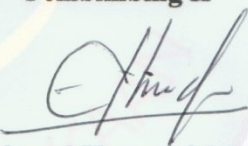
Oleh:  
**SUSANTI ANUGRAH RIZKI**  
NIM. 13630004

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 30 Mei 2018

**Pembimbing I**

  
**Anik Maunatin, S.T, M.P**  
NIP. 20140201 2 412

**Pembimbing II**

  
**Ahmad Hanapi, M.Sc**  
NIDT. 19851225 20160801 1 069



**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia**

  
**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN LAMA FERMENTASI  
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG  
DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**SUSANTI ANUGRAH RIZKI**  
NIM. 13630004

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 30 Mei 2018

<b>Penguji Utama</b>	<b>: Elok Kamilah Hayati, M.Si</b> NIP. 19790620 200604 2 002	(.....  .....)
<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Akyunul Jannah, S.Si, M.P</b> NIP. 19750410 200501 2 009	(.....  .....)
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>: Anik Maunatin, S.T, M.P</b> NIP. 20140201 2 412	(.....  .....)
<b>Anggota Penguji</b>	<b>: Ahmad Hanapi, M.Sc</b> NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....  .....)



Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia

  
**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Susanti Anugrah Rizki  
Nim : 13630004  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus plantarum*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 Mei 2018



Susanti Anugrah R  
13630004

## MOTTO

*“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.” (QS. Al-Insyirah,5-8)*



## HALAMAN PERSEMBAHAN



Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar. Sholawat dan Salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta para keluarga, sahabat serta pengikutnya.

Penulis mempersembahkan karya ini kepada Bapak dan ibuku Tercinta (Mulyo Sejati- Umi Sholikhah) yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan tiada henti untuk keberhasilan anaknya dan kedua adikku tersayang Erlina dwi yanti dan Luthya oktaviani. Kepada keluarga besar Bani faqih yang selalu mendukung secara langsung maupun tidak langsung.

Kepada ibu Anik maunatin S.T M.P yang saya anggap seperti ibu saya sendiri, terimakasih telah membimbing saya dengan sangat baik dan sabar hingga skripsi ini selesai dengan baik.

Tak lupa juga saya ucapkan terimakasih kepada sahabat kontrakan cetar (Dewi shinta, Maqfiratul Qudsiyah, Isa Khotimatus), sahabat penelitian yang super sabar (Ria Rosidah), sahabat kos Darussalam (Hikmah Nur yani, Eka Lizahara, Cahyani , Terry Perdana, Titik, Faizzatul H dan keluarga besar Kimia A yang tidak dapat disebutkan satu persatu, serta semua pihak yang telah membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Terimakasih atas segala semangat, doa, dukungan, keceriaan, kritik, saran, nasihat, dan perhatian yang telah diberikan.

Kepada Suamiku nantinya, Skripsi yang penuh dengan perjuangan dan kisah ini kupersembahkan buat kamu..☺

## KATA PENGANTAR

*Alhamdulillahirobbil 'alamin*, segala puji bagi Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang dan telah memberikan kenikmatan tiada terukur sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian dengan judul **“PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum*”**. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda rasul Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat, para pengikut dan juga pecintanya yang senantiasa meneruskan perjuangan sampai saat ini hingga akhir zaman.

Penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian laporan hasil penelitian ini. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Elok Kamilah, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian laporan hasil penelitian.
3. Ibu Anik Maunatin, S.T M.P selaku pembimbing, karena atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan, penulisan proposal penelitian ini dapat terselesaikan.

4. Ibu Akyunul Jannah, S.Si M.P selaku dosen konsultan yang dengan sabar memberikan arahan dan bimbingan sehingga saya dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian ini.
5. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc sebagai dosen pembimbing agama yang selalu memberikan arahan serta bimbingan sains dari perspektif Islam sehingga penulis dapat mengambil pelajaran dari setiap proses penyelesaian skripsi ini.
6. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Teman-teman mahasiswa angkatan 2013 yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun proposal penelitian.
8. Semua pihak yang telah membantu.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya serta menambah khasanah ilmu pengetahuan. Amin Ya Robbal A'lamiiin.

Malang, 28 Maret 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>مخلص البحث</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Batasan Masalah.....	8
1.5 Manfaat Penelitian.....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>9</b>
2.1 Perspektif Bakteri dalam Al-Qur'an .....	9
2.2 Bakteri Asam Laktat .....	10
2.3 Bakteriosin .....	11
2.3.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Antibakteri .....	15
2.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	16
2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	18
2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antimikroba .....	20
2.6 Purifikasi Protein .....	21
2.7 Antibakteri.....	24
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>27</b>
3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.2.1 Alat .....	27
3.2.2 Bahan .....	27
3.3 Rancangan Penelitian .....	28
3.4 Tahapan Penelitian .....	29
3.5 Prosedur Penelitian .....	29
3.5.1 Sterilisasi Alat .....	29
3.5.2 Pembuatan Media .....	29
3.5.3 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i> ...	30

3.5.4	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	30
3.5.5	Produksi Bakteriosin oleh <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	31
3.5.6	Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat .....	32
3.5.7	Penentuan Konsentrasi Protein .....	33
3.5.8	Uji Aktivitas Antimikroba .....	33
3.5.8.1	Pembuatan Media Bakteri <i>S.aureus</i> dan <i>E.coli</i> .....	33
3.5.8.2	Regenerasi Bakteri <i>S.aureus</i> dan <i>E.coli</i> .....	34
3.5.8.3	Pembuatan inokulum Bakteri <i>S.aureus</i> dan <i>E.coli</i> .....	34
3.5.8.4	Uji Aktivitas Antibakteri .....	34
3.5.9	Analisis Data .....	35
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>36</b>
4.1	Pembuatan Media .....	36
4.2	Regenerasi Bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	38
4.2.1	Pembuatan Inokulum .....	38
4.3	Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	39
4.4	ProduksiBakteriosinoleh <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	42
4.4.1	Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Bakteriosin .....	44
4.5	PurifikasiParsialmenggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis .....	49
4.6	Konsentrasi Protein Bakteriosin .....	50
4.7	Uji Aktivitas Bakteriosin .....	54
4.8	Tinjauan Bakteriosin dan Bakteri dalam Perspektif Islam .....	56
<b>BAB V PENUTUP .....</b>		<b>58</b>
5.1	Kesimpulan .....	58
5.2	Saran .....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>59</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>64</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Biosintesis bakteriosin.....	15
Gambar 2.2	Kurva pertumbuhan bakteri .....	17
Gambar 2.3	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	19
Gambar 2.4	Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen .....	20
Gambar 2.5	Metode purifikasi dengan ammonium sulfat .....	22
Gambar 2.6	Dialisis .....	24
Gambar 4.1	Kurva pertumbuhan bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	40
Gambar 4.2	Luas zona hambat antibakteri bakteriosin terhadap bakteri indikator .....	46
Gambar 4.3	Kurva standart protein bakteriosin .....	51
Gambar 4.4	Reaksi biuret dengan senyawa protein.....	53
Gambar 4.5	Luas zona hambat antibakteri bakteriosin setelah dimurnikan terhadap bakteri indikator.....	55

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Kombinasi perlakuan antara pengaruh variasi konsentrasi inokulum dan lama fermentasi.....	28
Tabel 4.1	Hasil uji antibakteri terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
Tabel 4.2	Hasil uji antibakteri terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	45
Tabel 4.3	Kadar konsentrasi protein bakteriosin dari <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	51
Tabel 4.4	Aktivitas penghambatan bakteriosin sebelum dan sesudah purifikasi.....	54



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan penelitian .....	62
Lampiran 2	Diagram alir.....	63
Lampiran 3	Perhitungan pembuatan bahan.....	70
Lampiran 4	Pembuatankurvapertumbuhan .....	77
Lampiran 5	Hasil uji antibakteri terhadap bakteri indikator.....	78
Lampiran 6	Data analisis <i>Two way</i> Anova	



## ABSTRAK

**Rizki, S. A. 2018. Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang dihasilkan Oleh *Lactobacillus plantarum*.** Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Anik Ma'unatin S.T, M.P., Pembimbing II: Ahmad hanapi, M.Sc., Konsultan: Akyunul jannah,S.Si M.P.

---

**Kata kunci :** Bakteriosin, *Lactobacillus plantarum*, Purifikasi parsial, Zona hambat

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dan memiliki sifat bakterisidal yaitu melawan bakteri patogen yang berbahaya bagi tubuh. *Lactobacillus plantarum* termasuk bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan metabolit sekunder salah satunya yaitu bakteriosin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap produksi bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum* dan untuk mengetahui pengaruh purifikasi bakteriosin terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin.

Produksi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Produksi bakteriosin yang tinggi identik dengan aktivitas antibakteri yang tinggi. Hasil produksi bakteriosin dipurifikasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis untuk menghilangkan pengaruh dari senyawa lain yang dihasilkan BAL. Kadar protein diuji menggunakan metode biuret dan diukur luas zona hambat sebagai aktivitas antibakteri.

Hasil analisis dengan Two way ANOVA menunjukkan bahwa uji aktivitas antibakteri bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan adanya interaksi antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi sedangkan pada *Escherichia coli* tidak menunjukkan interaksi antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi. Zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 5,0 mm dan bakteri *Escherichia coli* yaitu sebesar 4,2 mm. Hasil purifikasi menunjukkan konsentrasi protein sebesar 0,262 mg/ml dengan luas zona hambat sebesar 5, 61 terhadap *Staphylococcus aureus* dan 6,05 terhadap bakteri *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

**Rizki, S. A. 2018. The Effect Of Inoculum Concentration And Fermentation Period On Bacteriocin Antibacterial Activity Produced By *Lactobacillus plantarum*.** Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor I: Anik Ma'unatin S.T. M.P Supervisor II: Akyunul Jannah S.Si, M.P.

---

**Keyword :** Bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*, Partial purification, Inhibition zone

Bacteriocin is a protein compound produced by lactic acid bacteria (LAB) and has a bactericidal character that is against pathogenic bacteria. *Lactobacillus plantarum* includes lactic acid bacteria able to produce secondary metabolites like bacteriocin. The aims of this study are to determine the effect of inoculum concentration and fermentation period on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* and also to determine the effect of bacteriocin purification on bacteriocin antibacterial activity.

The production of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* was performed using disc diffusion method. High production of bacteriocin was identically with high antibacterial activity. Bacteriocin extract production was purified using ammonium sulfate and dialysis to remove the effect of other compounds produced by LAB. The protein concentration was tested using the biuret method and the inhibitory zone width measured as an antibacterial activity.

The result of analysis with Two way ANOVA showed that bacteriocin antibacterial activity test against *Staphylococcus aureus* showed an interaction between inoculum concentration and fermentation period while in *Escherichia coli* did not show interaction between inoculum concentration and fermentation period. The value of inhibition zone produced by *Staphylococcus aureus* was 5.0 mm and *Escherichia coli* was 4.2 mm. Purification results showed that value of protein concentration was 0.262 mg/ml with the value of inhibition zone was 5,61 on *Staphylococcus aureus* and 6.05 on *Escherichia coli*.

## ملخص البحث

رزقي، س. أ. ٢٠١٨. تأثير تركيز تلقيح وطول التخمر على مضاد للبكتيريا بكتريوسين المنتجة مع نبات العصية *Lactobacillus plantarum*. البحث الجامعي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة الأولى: أنيك معونة، الماجستير، والمشراف الثاني: أحمد حنفي، الماجستير، المستشار: أعين اللجنة: الماجستير

الكلمات الرئيسية: بكتريوسين ، *Lactobacillus plantarum* ، تنقية الجزئي ، منطقة المثبطة

بكتريوسين هو مركب بروتين الذي ينتج ببكتيريا حمض اللاكتيك وله خصائص جراثيم ضد البكتيريا المسببة للأمراض التي تضر الجسم. يتكون نبات العصية البكتريا حمض اللاكتيك الذي يقدر أن يحصل مستقلبات ثانوية يعنى بكتريوسين. يهدف هذا البحث إلى تحديد تأثير تركيز تلقيح وطول التخمر على منتج بكتريوسين المنتجة مع نبات العصية ولتحديد تأثير تنقية البكتريوسين على النشاط المضاد للجراثيم للبكتريوسين.

إنتاج البكتريوسين من نبات العصية أجرباستخدام طريقة انتشار القرص. إنتاج البكتريوسين العالي مرادف للنشاط المضاد للبكتيريا. نتائج إنتاجالبكتريوسينتنقيتها باستخدام كبريتات الأمونيوم وتحلل لإزالة آثار المركبات الأخرى التي تنتجها بال (BAL). اختبر محتوى البروتين باستخدام طريقة البيوريت وقيس واسعة المناطق التثبيط كنشاط مضاد للجراثيم.

دلت نتائج التحليل في اتجاهينأنوفأن اختبار النشاط المضاد للبكتيريا البكتريوسين ضد المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) عن التفاعل بين تركيز اللقاح وطول التخمر، وما دلت في الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*) التفاعل بين تركيز اللقاح وطول التخمر. منطقة التثبيط التي تنتجها بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية هي ٥.٠ ملم والبكتيريا الإشريكية القولونية يساوي ٤.٢ ملم. دلت النتائج التنقية التركيز البروتين بقدرة ٠,٢٦٢، ملغ / مل مع واسعة المناطق التثبيط ٥، ٦١ على المكورات العنقودية الذهبية و ٦.٠٥ على الإشريكية القولونية

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kontaminasi mikroba patogen yang terdapat dalam bahan pangan seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium batulinum*, *Bacillus cereus* dan *Salmonella* sp menyebabkan terjadinya degradasi protein sehingga sel-sel pada makanan akan mengalami kerusakan atau busuk (Razak, 2009). Usaha untuk mengontrol adanya mikroorganisme pada bahan pangan dapat dilakukan dengan penambahan zat antimikroba atau biopreservasi yang dimiliki oleh bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat (BAL) dapat memberikan dampak positif bagi kesehatan manusia karena dapat membantu penyerapan makanan, mencegah pertumbuhan bakteri patogen dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Cartney, 1997).

BAL telah dikenal dalam industri pangan sebagai kultur starter dalam berbagai produk makanan dan minuman fermentasi seperti yogurt, daging, keju, susu dan buah buahan. BAL dapat mengendalikan pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk pada bahan makanan sehingga produk makanan dan minuman dapat bertahan lama (Paulus, 2009). Penambahan BAL dalam makanan dan minuman tidak mendatangkan resiko berbahaya terhadap kesehatan karena bakteri asam laktat membantu pengolahan dalam sistem pencernaan dalam tubuh.

Allah telah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi baik yang bersifat makroskopik dan mikroskopik dengan sempurna dan tanpa sia-sia, sebagaimana dalam Surat Al-Furqon ayat 2 yang berbunyi:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

*Artinya: “yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan (Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya.”(QS. Al-Furqan:2).*

Tafsir Quraish Shihab (2015) menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi telah ditentukan batas-batas, ukuran dan aturan yang sangat cermat dengan rahasia-rahasia yang dapat menjamin keberlangsungan tugasnya secara teratur (sistematis). Semua itu berjalan menurut hukum dan aturan yang bersifat konstan dan teliti yang menggambarkan secara jelas kebesaran dan kekuasaan Allah Swt. Seperti halnya bakteri yang berukuran sangat kecil mempunyai waktu tertentu untuk melakukan pertumbuhan dan perkembangbiakan sehingga pada saat fase tertentu bakteri dapat menghasilkan suatu manfaat untuk keberlangsungan hidup manusia. Antara bakteri satu dengan bakteri yang lain terdapat hubungan timbal balik yang mana pada sisi lain bakteri dapat menyebabkan penyakit dan pada sisi lain bakteri dapat dimanfaatkan sebagai obat.

Keberadaan bakteri banyak dikaitkan dengan dampak negatif yang merugikan bagi kehidupan hewan, tumbuhan dan manusia karena banyak ditemukan mikroorganisme patogen yang menyebabkan berbagai macam penyakit dengan sifat-sifat kehidupannya yang khas. Disamping itu, masih banyak manfaat yang dapat diambil dari mikroorganisme tersebut salah satunya yaitu senyawa antimikroba berpotensi sebagai pengawet bahan pangan yaitu bakteriosin. Hal ini telah dijelaskan dalam firman Allah surat Ali-imran ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا  
مَا خَلَقْتَهُذَا بَطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: (Orang-orang yang mempunyai akal yang cerdas) yaitu orang-orang yang mengingat Allah saat dia berdiri, duduk dan berbaring, mereka memikirkan tentang penciptaan langit-langit dan bumi (kemudian berkata) Wahai Pemelihara kami, Engkau tidak menciptakan semua ini sia-sia. Maha suci Engkau, maka jagalah kami dari adzab neraka.

kata *يَذْكُرُونَ* dan *يَتَفَكَّرُونَ* menunjukkan bahwa orang-orang yang cerdas adalah Orang-orang yang menggunakan akalnya dengan baik dan selalu ingat kepada Allah dalam kondisi apapun baik berdiri, duduk dan berbaring. Selain itu, mereka selalu memikirkan tentang penciptaan langit-langit dan bumi. Saat memikirkan itu, mereka benar-benar sadar bahwa Allah tak pernah menciptakan segala sesuatu dengan sia-sia dan pasti ada tujuannya. Sama halnya dengan bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL yang berpotensi sebagai biopreservatif.

Bakteriosin didefinisikan sebagai protein aktif atau kompleks protein yang mempunyai efek bakterisidal yaitu mampu melawan bakteri gram positif terutama spesies yang berkerabat dekat dengan spesies penghasil (Paraday, dkk., 2007). Bakteriosin disintesis didalam ribosom oleh bakteri asam laktat agar dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Najmudin,2006). Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga potensial digunakan sebagai biopreservatif yaitu bukan bahan toksik dan sensitif terhadap enzim proteolitik, mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan, dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pengawet pangan, penggunaannya stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin (Cleveland dkk, 2001).

Produksi bakteriosin secara maksimal dapat dilakukan pada kondisi optimum meliputi suhu, waktu, konsentrasi inokulum dan medium fermentasi (Razak, 2009). Bakteriosin yang dihasilkan dari bakteri asam laktat mencapai produk tertinggi dengan aktivitas penghambatan terbesar pada pertengahan fase pertumbuhan eksponensial hingga fase stationer yaitu pada waktu inkubasi 24 jam dan aktivitasnya akan berkurang bahkan tidak terdeteksi lagi setelah masa inkubasi 35 jam (Kusmiati dkk, 2002). Salah satu bakteri asam laktat yang menghasilkan bakteriosin dengan zona hambat terbesar dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya adalah *Lactobacillus plantarum*.

*Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang berbentuk batang dan mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. *Lactobacillus plantarum* mempunyai kemampuan dalam menghambat mikroorganisme patogen pada bahan pangan dengan zona hambat terbesar dibandingkan dengan asam laktat lainnya (Syahniar, 2009). Pada penelitian Anas (2008) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* mempunyai kemampuan untuk menghambat mikroorganisme patogen dengan daerah penghambatan sebesar 28 mm dibandingkan BAL lainnya yaitu *L. casei* yang menghambat mikroorganisme patogen sebesar 26 mm, *L.rhamnosus* sebesar 19 mm dan *L. acidophilus* sebesar 16 mm. Bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* dinamakan *plantaricin* (Arief, 2012). Pada penelitian Hariani (2013) menunjukkan *Lactobacillus plantarum* mempunyai aktifitas penghambatan bakteriosin lebih kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* daripada *Escherichia coli* yaitu masing-masing 5 mm dan 4 mm.

Penelitian produksi bakteriosin dari BAL telah berkembang selama dekade terakhir, akan tetapi belum sepenuhnya dieksplorasi dan digunakan sebagai biopreservasi karena teknik produksi bakteriosin terbatas. Produksi bakteriosin dapat diperoleh secara maksimal dengan memvariasikan antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi. Pengaruh konsentrasi inokulum telah dilaporkan oleh Sifour (2012) yang memproduksi dan mengkarakterisasi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* F12 menggunakan konsentrasi inokulum 1% yang menghasilkan supernatan bebas sel dengan diameter zona hambat sebesar 20 mm. Pengaruh konsentrasi inokulum terhadap proses fermentasi juga dijelaskan Razak,dkk (2009) Produksi senyawa bakteriosin secara fermentasi menggunakan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 dari dangke menggunakan konsentrasi inokulum sebanyak 5% dalam setiap perlakuan dapat memberikan zona hambat pada bakteri *Salmonella typhimurium* sebesar 6,40 mm. Pengaruh variasi konsentrasi inokulum dijelaskan oleh Jati (2012) yang melakukan produksi bakteriosin kasar *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1A5, 1B1 dan 2B2 asal daging sapi dengan konsentrasi inokulum 10% memiliki aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *Escherichia coli* ATCC25922 sebesar 8,17 mm, *S.Thypimurium* ATCC14028 sebesar 8,74 mm dan *B.cereus* sebesar 8,82 mm.

Faktor lama fermentasi juga menentukan hasil produksi bakteriosin. Indikator lama fermentasi yang terbaik adalah waktu dimana senyawa antimikroba bakteriosin diproduksi dengan optimal yang ditandai dengan luasnya zona bening yang terdapat disekitar cakram pada semua mikroba uji. Menurut Suwayvia (2012) produksi optimal bakteriosin terjadi pada fase logaritmik akhir. Didukung oleh penelitian Ogunbawo (2003) yang mengatakan bahwa produksi optimum

bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* OG1 terdeteksi pada fase pertumbuhan eksponensial dan mencapai maksimum pada awal fase stasioner. Sebagai mana penelitian yang telah dilakukan oleh Khoiriyah (2014) penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas bakteriosin dari *Lactobacillus sp* RED4 terdeteksi pada fase stasioner dimana bakteriosin dapat menghambat semua mikroba uji dengan rata zona hambat paling besar yaitu *Salmonella sp* sebesar 3,22 mm dan *Escherichia coli* sebesar 6,79 mm. Jati (2012) yang melakukan produksi bakteriosin kasar *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1A5, 1B1 dan 2B2 dengan lama fermentasi 24 jam memiliki aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *Escherichia coli* sebesar 8,17mm, *S.thypimurium* ATCC 14028 sebesar 8,74 mm dan *B.cereus* sebesar 8,82mm.

Produksi bakteriosin yang telah divariasi konsentrasi inokulum dan lama fermentasi dilanjutkan dengan memisahkan metabolit sekunder dari sel bakteri menggunakan sentrifugasi sehingga dihasilkan supernatan bakteriosin kasar. Setiap supernatant bakteriosin yang telah dihasilkan dilanjutkan uji aktivitas antibakterinya. Pada penelitian ini metode yang digunakan adalah metode difusi cakram terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram negatif *Escherichia coli* (Suwayvia, 2012). Bakteriosin dengan zona hambat terbesar dilakukan purifikasi parsial menggunakan ammonium sulfat untuk memaksimalkan aktivitas antibakteri bakteriosin dan juga diharapkan dapat menghilangkan pengaruh asam organik (Syahniar, 2009). Penelitian yang telah dilakukan Arief (2011) mengenai senyawa antimikroba bakteriosin oleh *lactobacillus plantarum* setelah dimurnikan dapat menghambat pertumbuhan

bakteri patogen lebih besar terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 9,03 mm, dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebesar 8,34 mm.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dijabarkan, dapat diketahui bahwa konsentrasi inokulum dan lama fermentasi mempunyai peranan penting dalam proses produksi bakteriosin sehingga perlu dikembangkan agar proses produksi dapat berjalan secara optimum dengan kadar bakteriosin yang cukup tinggi. Dilanjutkan purifikasi untuk mengetahui pengaruh purifikasi bakteriosin terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin sehingga menghasilkan produk bakteriosin murni dengan aktivitas antibakteri yang besar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi pada produksi bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*?
2. Bagaimana pengaruh purifikasi bakteriosin terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap produksi bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*.
2. Untuk mengetahui pengaruh purifikasi bakteriosin terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin.

#### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Sumber bakteri yang digunakan adalah bakteri *Lactobacillus plantarum* yang dibeli dari Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta.
2. Variasi konsentrasi inokulum yang digunakan yaitu 1%, 5%, dan 10%.
3. Variasi lama fermentasi yang digunakan yaitu 24 jam, 28 jam dan 32 jam.
4. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
5. Metode purifikasi bakteriosin menggunakan amonium sulfat.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi pada produksi bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum* dan juga pengaruh purifikasi bakteriosin terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Perspektif Bakteri dalam Al-Qur'an

Bakteri merupakan organisme mikroskopik terbanyak yang hidup bebas dan terdapat disemua tempat seperti udara, tanah, debu, air, didalam tubuh hewan, tumbuhan dan manusia. Bakteri mudah tumbuh dan mengkontaminasi bahan makanan yang menyebabkan produk makanan dan minuman rentan busuk ataupun basi. Di jaman sekarang ini, masyarakat tidak hanya menuntut aspek kenikmatan dari produk pangan tetapi juga menghendaki aspek kesehatan dan keamanan. Usaha mengontrol adanya mikroorganisme pada bahan pangan dapat dilakukan dengan metode pengawetan/preservasi.

Keberadaan makhluk kecil seperti bakteri ini telah disebutkan Allah dalam surah Al-Baqarah ayat 26 sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةٌ فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ  
 الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا  
 وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya : “*Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?" Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik*”

Ibnu katsir (2015) menafsirkan bahwa lafadz *fama fauqohaa* menunjukkan bahwa Allah SWT kuasa untuk menciptakan apa saja, yaitu penciptaan apapun dengan objek apa saja, baik yang besar maupun yang lebih kecil. Allah SWT tidak pernah

menganggap remeh sesuatu pun yang Dia ciptakan meskipun hal itu kecil, tidak terkecuali dengan makhluk hidup bersel tunggal seperti bakteri. Orang-orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang dilakukan oleh Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia (Al-mubarak, 2006).

## 2.2 Bakteri Asam Laktat (BAL)

BAL merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba dan hasil metabolisme lain yang dapat memberikan dampak positif bagi tubuh. Manfaat bagi kesehatan yang dihasilkan dari BAL yaitu memperlancar daya cerna laktosa, mengendalikan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, menurunkan serum kolesterol, menghambat tumor, antimutagenik, antikarsinogenik, menstimulir sistem imun, pencegahan sembelit, produksi vitamin B, inaktivasi berbagai senyawa beracun dan produksi bakteriosin (Bachrudin, dkk., 2000).

BAL memiliki karakteristik morfologi, fisiologi dan metabolit tertentu. Secara umum dari BAL termasuk dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat maupun batang serta menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama memfermentasi karbohidrat (Axelsson, 2004). Pada fermentasi homofermentatif akan menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya sedangkan pada fermentasi heterofermentatif akan dihasilkan asam laktat dan produk samping seperti asam asetat, etanol dan karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Secara garis besar, keduanya memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan diubah menjadi laktat (atau asam laktat) dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD<sup>+</sup> (Irawati, 2011).

BAL memproduksi berbagai komponen bermassa molekul rendah termasuk asam, alkohol, karbon dioksida, diasetil, hidrogen peroksida dan metabolit lainnya. Salah satu manfaat penting dari BAL adalah kemampuannya memproduksi komponen antimikroba, khususnya bakteriosin yang berpotensi menjadi biopreservatif menggantikan pengawet kimiawi pada bahan makanan guna memperpanjang daya simpan produk. Kemampuan bakteriosin dalam melakukan aktivitasnya sebagai biopresevatif dicapai dari kemampuan daya hambatnya terhadap mikroorganisme patogen yang berbahaya (Savadojo, dkk., 2006).

### 2.3 Bakteriosin

Bakteriosin yang diproduksi oleh BAL didefinisikan sebagai protein aktif atau kompleks protein yang menunjukkan aksi bakterisidal melawan bakteri Gram positif dan terutama spesies yang berkerabat dekat dengan spesies penghasil, namun ada beberapa yang secara efektif melawan banyak bakteri dari spesies dan genus yang berbeda (Raydan Bhunia, 2008).

Bakteriosin yang diproduksi oleh BAL digolongkan dalam tiga kelas utama berdasarkan pada karakteristik biokimia dan sifat genetiknya, yaitu (Barefoot, dkk., 1993; Neetles, dkk., 1993; Tagg *et al.*, 1976):

#### 1. Kelas I

Bakteriosin kelas ini disebut sebagai Lantibiotik. Peptida pada bakteriosin ini merupakan peptida berbobot molekul kecil (<5 kDa). Berdasarkan gugus fungsional dan strukturalnya, lantibiotik dibagi dalam dua tipe yaitu tipe A dan B. Lantibiotik tipe A merupakan peptida kationik dan diperpanjang dengan jembatan *lanthionine*. Peptida ini bekerja dengan mengganggu membran sel organisme

target (contoh: nisin, subtilin dan epidermin). Lantibiotik tipe B merupakan peptida berbentuk bulat dan lebih kecil (sampai 19 residu asam amino). Peptida ini bekerja dengan mengganggu fungsi enzim organisme target, seperti menghambat biosintesis dinding sel (contoh: mersasidin, duramisin dan aktagardin).

## 2. Kelas II

Merupakan peptida berbobot molekul kecil (<10 kDa) yang tidak mengalami modifikasi dan tahan terhadap panas. Bakteriosin kelas ini membentuk struktur helik (amfipatik) dengan variabel hidrofobisitas dan struktur *E-Sheet*. Peptida ini stabil dalam pemanasan 100°C-121°C. Sejauh ini, lebih dari 50 bakteriosin kelas II dari BAL yang telah diisolasi dan dikarakterisasi. Pengelompokan bakteriosin kelas II meliputi:

- a. Kelas IIa : Pediosin, merupakan subkelas paling besar dan paling banyak dipelajari. Peptida ini memiliki aktivitas anti-listerial yang kuat dan identitas paling besar dalam sekuensing (40-70%).
- b. Kelas IIb: Bakteriosin dua-peptida, Bakteriosin ini membutuhkan kombinasi dua peptida untuk aktivitas antimikroba penuh. Aktivitas tersebut tetap ada walaupun digunakan peptida secara terpisah, tetapi sangat dipengaruhi oleh keberadaan peptida kedua. Kecuali pada peptida laktosin G dan laktosin 705 yang tidak mempunyai aktivitas antimikroba jika digunakan secara terpisah.
- c. Kelas IIc: Bakteriosin yang *sec-dependent*. Bakteriosin ini akan menyeberangi membran sitoplasma melalui jalur sekresi *sec dependent*

(contoh: asidosin B, divergisin A, bakteriosin 31, enterosin P, dan listeriosin 743A).

- d. Kelas IId: Bakteriosin tanpa sekuensing utama. Tidak seperti bakteriosin lain, bakteriosin ini disintesis tanpa terminal N utama atau sinyal sekuensing. Subkelas ini terdiri dari dua komponen bakteriosin enterosin L50 dan peptida tunggal enterosin Q, yang diproduksi oleh *Enterococcus faecium* L50, dan Aurosin A70 oleh *Staphylococcus aureus* A70.
- e. Kelas IIe: Bakteriosin dengan peptida siklik. Berbeda dengan bakteriosin linear, bakteriosin ini menjadi siklik oleh formasi pengikat peptida kepala-ekor. (contoh: AS-48, gasserisin A, sirkularin A)
- f. Kelas IIIf: Bakteriosin lain yang tidak dimodifikasi. Kelompok ini berisi bakteriosin kelas II lain yang tidak menyerupai struktur dan motif dari subkelas manapun.

### 3. Kelas III

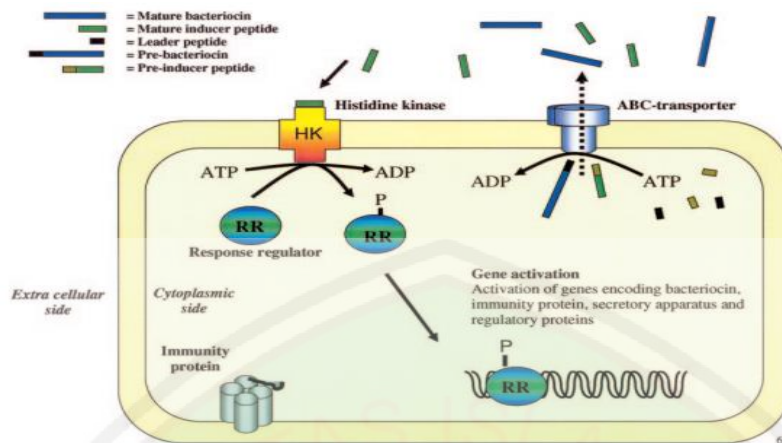
Peptida yang berbobot molekul besar (>30 kDa) dan tidak tahan panas. Hanya beberapa bakteriosin dari kelas ini yang telah diidentifikasi (contoh: helvetisin J, helvetisin V, acidophilusin A, laktasin A dan B).

Bakteriosin tersusun dari senyawa protein yang mengikuti pola sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstra kromosomal dan dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama pH. Bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal. Prinsip regulasi sintesis bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas(Usmiati, 2012).

Ada tiga tahapan sintesis bakteriosin yaitu yang pertama replikasi DNA, dimana proses memperbanyak bahan genetik atau DNA yang berbentuk heliks

ganda akan membelah diri dan masing-masing rantai polinukleotida mampu membentuk rantai baru dengan pasangannya. Tahap kedua yaitu transkripsi, pembentukan molekul RNA sesuai yang diperintahkan oleh DNA, molekul RNA bertindak sebagai perantara dalam sintesis protein. Tahap ketiga yaitu translasi, molekul RNA menerjemahkan informasi genetik yang diberikan oleh DNA untuk pembentukan protein (Poedjiadi, 2004).

Biosintesis bakteriosin dimulai dengan pembentukan peptida penginduksi (Induction factor/ IF) dan prepeptida bakteriosin. Prepeptida dan IF ini kemudian diurai dan dikeluarkan melalui ABC transporter. Pada batas konsentrasi tertentu dari peptida penginduksi yang telah dikeluarkan, histidin protein kinase (HPK) menjadi aktif dan menyebabkan terjadinya autofosforilasi. Detail molekular mengenai bagaimana peptida penginduksi mengaktifkan HPK belum banyak diketahui. HPK yang telah aktif kemudian berinteraksi dengan protein respon regulator (RR) melalui proses transfosforilasi dimana grup fosfat yang berada pada residu histidin pada HPK yang aktif berpindah ke RR. Reaksi fosforilasi ini mengaktifkan fungsi RR sebagai aktivator transkripsi yang mengikat promotor gen spesifik bakteriosin dan merangsang transkripsi. RR juga mengaktifkan gen yang mengkodekan 3 komponen sistem regulator dan dimulailah *feedback* positif (Dride, 2006).



Gambar 2.1 Biosintesis bakteriosin (Supardjo, 2008)

### 2.3.1 Faktor–Faktor yang Mempengaruhi Produksi Bakteriosin Yaitu Sebagai Berikut (Salminen dkk, 2004):

#### 1. pH Substrat

BAL mampu bertahan dibawah pH 4. Semakin rendah pH substrat maka banyak  $H^+$  yang terbebas ke dalam substrat dan menempel pada membran. Hal ini menyebabkan sisi aktif enzim berubah. Dengan demikian pH substrat tidak sesuai akan mengganggu permeabilitas membran dan menghambat produksi antibakteri. pH substrat yang sesuai akan menghasilkan banyak antibakteri secara maksimal.

#### 2. Waktu Inkubasi

Waktu inkubasi disesuaikan dengan pertumbuhan bakteri dalam memproduksi antibakteri. BAL memerlukan waktu inkubasi optimum selama 48 jam atau 3 hari untuk memproduksi banyak antibakteri.

#### 3. Umur Bakteri

BAL hanya dapat bertahan selama 1 bulan karena tidak menghasilkan spora. Umur bakteri sangat mempengaruhi produksi antibakteri. Kemungkinan BAL yang terlalu tua akan mengalami fase kematian. Kemampuan bakteri akan

berkurang untuk menyerap nutrisi sehingga permeabilitas dalam membran terganggu. Umur bakteri yang sesuai dapat memproduksi banyak antibakteri secara optimal.

#### **4. Suhu**

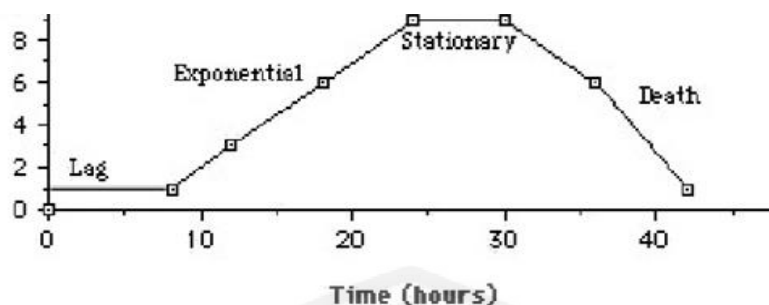
BAL mampu bertahan pada suhu 30°C (anaerob fakultatif). Suhu yang sesuai akan mempengaruhi banyak produksi antibakteri. Suhu bakteri yang sesuai dapat dilihat dengan besarnya zona hambat.

#### **5. Konsentrasi Inokulum**

Inokulum merupakan biakan bakteri yang dimasukkan kedalam media cair yang siap digunakan untuk fermentasi (Pelczar, dkk., 2007). Kadar inokulum pada fermentasi menunjukkan pengaruh terhadap produk fermentasi (Franca, dkk., 2009).

##### **2.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri**

Kurva pertumbuhan menunjukkan perkembangbiakan bakteri. Pertumbuhan bakteri merupakan suatu peningkatan massa atau jumlah sel total dan bukan dalam hal ukuran. Pertumbuhan sel dan pembentukan produk mencerminkan kemampuan sel yang dapat dipengaruhi oleh lingkungan. Pelczardan Chan(2007) menyatakan bahwa istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya menunjukkan perubahan di dalam hasil panen (pertambahan total masa sel) dan bukan perubahan individu organisme.



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan bakteri  
Sumber : Food Tecnology (2012)

Empat fase siklus pertumbuhan bakteri menurut Todar (2009) adalah (1) Fase Adaptasi, yakni fase dimana setelah inokulasi sel kedalam media tumbuh, bakteri di dalam nya relatif tetap atau tidak berubah untuk sementara waktu. Lamanya fase adaptasi atau fase lag akan tergantung pada berbagai faktor termasuk ukuran inokulum, waktu yang diperlukan untuk pulih dari kerusakan fisik atau stress pada saat inokulasi, waktu yang diperlukan untuk sintesis koenzim penting dan waktu yang dibutuhkan untuk mensintesis enzim baru yang diperlukan untuk membantu metabolisme substrat yang terdapat didalam media tumbuh. (2) Fase Eksponensial (logaritmik) adalah fase pertumbuhan yang seimbang dimana semua sel-sel membelah diri secara teratur melalui pembelahan biner. Sel-sel membelah dengan konstan tergantung pada komposisi media pertumbuhan dan kondisi inkubasi. Laju pertumbuhan eksponensial dari kultur bakteri disebut sebagai waktu generasi bakteri atau penggandaan populasi bakteri. (3) Fase Stasioner, tidak dapat ditentukan apakah beberapa sel telah mati dan sejumlah sel-sel lainnya sedang membelah diri atau bahkan populasi sel tersebut telah berhenti tumbuh dan membelah diri. Bakteri yang menghasilkan metabolit sekunder, seperti antibiotik melakukan metabolit sekunder selama fase stasioner dalam siklus pertumbuhan dan (4) Fase Kematian, dimana terjadi penurunan

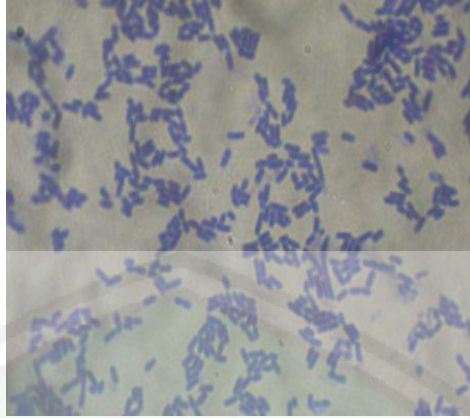
terhadap populasi sel hidup. Selama fase kematian, jumlah sel yang hidup menurun secara geometris (eksponensial) atau berkebalikan dari pertumbuhan selama fase logaritmik.

Bakteriosin mencapai produksi tertinggi dengan aktivitas penghambatan terbesar pada pertengahan fase pertumbuhan eksponensial hingga awal fase stasioner dan aktivitasnya akan berkurang bahkan tidak terdeteksi lagi selama fase pertumbuhan stasioner (Rashid *dkk.*, 2009).

Salah satu BAL yang berpotensi menghambat mikroorganisme patogen pada bahan pangan dan memiliki daerah penghambatan terbesar dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya adalah bakteri *Lactobacillus plantarum*.

#### 2.4 *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu jenis BAL homofermentatif yang tumbuh optimal pada suhu 30-37°C serta pada pH 5-7 dengan ciri-ciri sel berbentuk batang pendek, warna koloni putih susu sampai abu-abu, serta mempunyai viabilitas tinggi untuk digunakan sebagai starter (Emanuel, *dkk.*, 2005). *Lactobacillus plantarum* mempunyai kemampuan untuk menghambat mikroorganisme patogen pada bahan pangan dengan daerah penghambatan terbesar dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya (Jenie dan Rini, 1995). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Lactobacillus plantarum* diklasifikasikan sebagai berikut (Fellis dan Dellaglio, 2008):

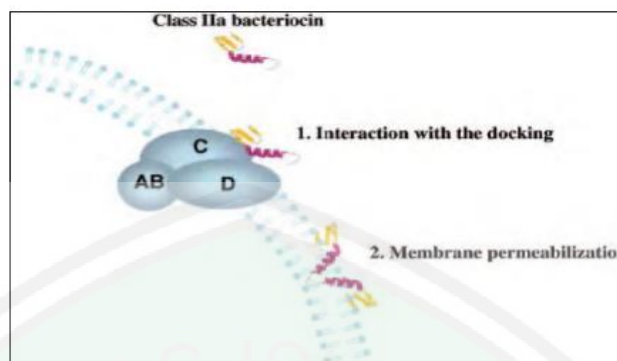


Gambar 2.3. *Lactobacillus plantarum*

Kingdom	:	Bacteria
Divisi	:	Firmicutes
Kelas	:	Bacilli
Ordo	:	Lactobacillales
Famili	:	Lactobacillaceae
Genus	:	Lactobacillus
Spesies	:	<i>L. plantarum</i>

Menurut Permanasari (2008) Antimikroba yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* 1A5 mempunyai aktivitas penghambatan paling besar terhadap ketiga bakteri uji. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC25923 menghasilkan diameter zona hambat dengan rata-rata 8,99 mm *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan rata-rata 7,87 mm dan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dengan rata-rata 11,76 mm. Selain itu, nilai konsentrasi penghambatan minimumnya terhadap ketiga bakteri uji yaitu 90% .

## 2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antimikroba



Gambar 2.4. Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen (Drider dkk. 2006)

Mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroba yaitu dengan cara merusak dinding sel bakteri yang menyebabkan lisis sehingga akan mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi di dalam sel, merusak sistem metabolisme dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler (Pelczar, dkk., 1986 dalam Syahniar, 2009). Beberapa cara antimikroba dalam melawan mikroorganisme yaitu dengan cara memberikan efek bakteriostatik, bakterisidal ataupun bakterilisis. Sifat bakteriostatik akan menghambat pertumbuhan dan replikasi mikroorganisme namun tidak menyebabkan kematian. Sifat bakterisidal berhubungan dengan kemampuan senyawa untuk menyebabkan kematian mikroorganisme, sedangkan sifat bakterilisis akan menyebabkan lisis sel mikroorganisme (Gonzales, dkk., 1996).

Bakteriosin BAL memiliki sifat bakterisidal terhadap sel sensitif dan dapat mengalami kematian dengan sangat cepat pada konsentrasi rendah. Beberapa bakteriosin mempunyai sifat bakterisidal melawan beberapa strain dan spesies yang berelasi dekat tetapi beberapa dapat efektif melawan banyak strain dalam

spesies dan generasi yang berbeda. Namun, sel penghasil bakteriosin dapat mengalami ketahanan terhadap bakteriosin yang dihasilkan nya sendiri, Bakteriosin ini pada umumnya sangat efektif melawan sel dari bakteri Gram positif yang lain (Syahniar, 2009).

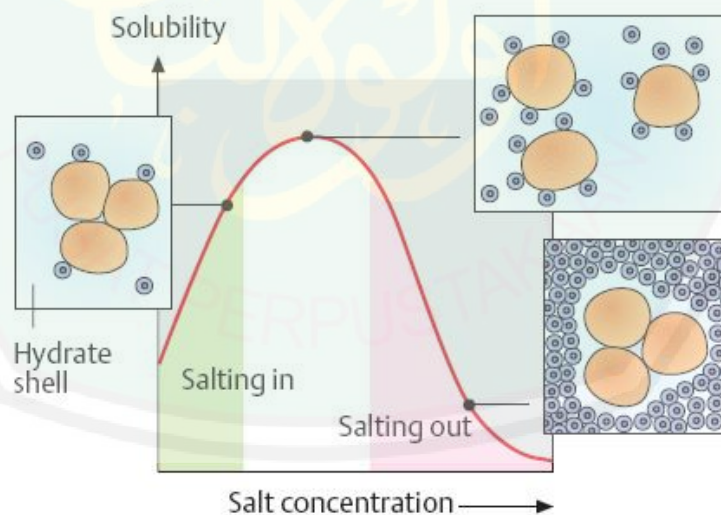
Penentuan aktivitas antimikroba adalah terjadinya interaksi awal antara molekul-molekul kationik dari bakteriosin dengan polimer-polimer anionik di permukaan sel, salah satunya adalah asam teikoat. Asam teikoat tersebut merupakan reseptor bakteriosin yang hanya dihasilkan oleh bakteri Gram positif. Selanjutnya, aksi bakterisidal dari bakteriosin melawan sel yang sensitif akan dihasilkan melalui destabilisasi fungsi dari membran sitoplasmik, berupa peningkatan permeabilitas membran sehingga mengganggu keseimbangan barier dan dapat mengakibatkan kematian sel (Jack,dkk.,1995). Mekanisme-mekanisme aksi lainnya dari bakteriosin antara lain perubahan aktivitas enzim, penghambatan germinasi spora dan inaktivasi pembawa anionik langsung membentuk pori-pori selektif dan non selektif (Ray, 2004).

## **2.6 Purifikasi Protein**

Metode yang dapat digunakan dalam purifikasi bakteriosin adalah metode purifikasi protein. Purifikasi protein umumnya menggunakan prosedur isolasi yaitu memisahkan protein yang dibutuhkan dari makromolekul lain yang tidak diinginkan. Metode pemisahan protein yang banyak digunakan adalah pengendapan menggunakan ammonium sulfat (Arief, 2005). Proses pengendapan protein dengan garam ammonium sulfat lebih sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan garam-garam yang lain yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai

pengendapan yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya terjangkau (Scopes, 1982).

proses ionisasi protein dipengaruhi oleh jumlah penambahan garam amonium sulfat, pada konsentrasi garam amonium sulfat yang tinggi peningkatan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik molekul-molekul air dan protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menyebabkan pengendapan protein yang disebut dengan *salting out*. Sedangkan pada penambahan garam amonium sulfat dengan konsentrasi rendah, ion-ion ini akan melindungi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein melarut. Peristiwa ini disebut sebagai *salting in* (Scopes, 1982).



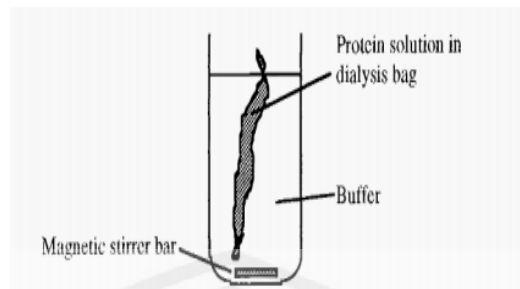
Gambar 2.5 Metode purifikasi dengan amonium sulfat

Pengendapan protein dengan amonium sulfat dilakukan pada kondisi dingin yaitu 2°C - 4°C sehingga protein akan mengendap tanpa mengalami denaturasi.

Menurut Tokuyasu,dkk (1996) dalam arief (2005) banyak keuntungan menggunakan garam ammonium sulfat karena mempunyai kelarutan tinggi, pH moderat, relatif lebih murah, non toksik dan tidak mempengaruhi enzim.

Rangkaian metode selanjutnya adalah melakukan dialisis. Prinsip dialisis yaitu pemisahan molekul-molekul yang berukuran besar dari molekul-molekul berukuran kecil dengan gaya difusi selektif melalui membran semipermeabel. Sampel protein umumnya mengandung komponen yang tidak diinginkan seperti garam ammonium sulfat. Garam-garam tersebut dapat menjadi inhibitor aktivitas enzim atau mengurangi kelarutan protein hingga harus dipisahkan dari protein (Arief, 2005).

Salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan kemurnian enzim adalah dialisis. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul-molekul yang berukuran kecil dengan bantuan membran semipermeabel. Pemisahan ini penting dilakukan agar garam-garam anorganik tidak mengganggu tahap pemurnian selanjutnya. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak akan dapat keluar dari kantong selofan. Penggunaan kantong selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan dan memiliki harga yang relatif terjangkau (Kristanti, 2001).



Gambar 2.6 Dialisis (Dennison, 2002)

Proses dialisis yaitu difusi selektif yang melewati membran selofan. Selofan yang membungkus larutan protein memungkinkan buffer dan molekul kecil seperti garam dengan bebas keluar selofan melalui pori-pori. Larutan diluar selofan adalah larutan yang memiliki konsentrasi yang lebih kecil agar molekul dapat berdifusi keluar (Yuningsih, 2006).

## 2.7 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Antibakteri ada yang memiliki spektrum hambat yang luas artinya antibakteri ini efektif untuk diaplikasikan bagi semua bakteri baik kokus, basil maupun spiril. Adapula yang memiliki spektrum hambat yang kecil artinya hanya efektif untuk diaplikasikan pada spesies bakteri tertentu. (Waluyo, 2004).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri diawali perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan bahan makanan keluar dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi,

bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja secara bakteriostatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik (Pelczar dan Chan, 1988).

Menurut Madigan dkk. (2000), berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, senyawa antimikrobia mempunyai 3 macam efek terhadap pertumbuhan mikrobia yaitu:

1. Bakteriostatik memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh. Senyawa bakterostatik seringkali menghambat sintesis protein atau mengikat ribosom. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antimikrobia pada kultur mikrobia yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antimikrobia pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total maupun jumlah sel hidup adalah tetap.
2. Bakteriosidal memberikan efek dengan cara membunuh sel tetapi tidak terjadi lisis sel atau pecah sel. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antimikrobia pada kultur mikrobia yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antimikrobia pada fase logaritmik didapatkan jumlah sel total tetap sedangkan jumlah sel hidup menurun.
3. Bakteriolitik menyebabkan sel menjadi lisis atau pecah sel sehingga jumlah sel berkurang atau terjadi kekeruhan setelah penambahan antimikrobia. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan antimikrobia pada kultur mikrobia yang berada pada fase logaritmik. Setelah penambahan zat antimikrobia pada fase logaritmik, jumlah sel total maupun jumlah sel hidup menurun.

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. *Disc diffusion test* atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu  $10^5$ - $10^8$  CFU/mL (Hermawan dkk., 2007). Pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro* dapat dilakukan melalui dua cara yakni (Tortora, dkk., 2001):

#### 1. Metode Difusi Cakram

Prinsip metode difusi cakram adalah dengan menempatkan kertas cakram yang berisi senyawa antibakteri dan diletakkan pada media padat yang telah dicampur dengan bakteri uji. Metode ini akan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri uji. Bakteri yang sensitif terhadap senyawa antibakteri ditandai dengan adanya zona hambat disekitar cakram dan sebaliknya.

#### 2. Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah penggunaan satu seri tabung reaksi dengan medium cair dan sejumlah bakteri uji kemudian masing-masing seri tabung reaksi berisi bakteri uji ditambahkan senyawa antibakteri. Metode dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dengan ditunjukkan adanya perbedaan kekeruhan. Hasil positif ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih. Biakan dari tabung yang jernih ditumbuhkan pada media agar padat dan diamati apakah terdapat koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah senyawa antibakteri pada biakan medium agar padat ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang disebut dengan konsentrasi bunuh minimum senyawa antibakteri terhadap bakteri uji.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli - Desember 2017 di Laboratorium Riset Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Laminar Air Flow*, spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik, hot plate, autoclave, *shaker*, Sentrifus, mikropipet, vortex, Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, rak tabung reaksi, beaker glass, jarum ose, pipet tetes, spatula, stirer, gelas ukur, aluminium foil, kapas, plastik wrap, bunsen, korek api, pH meter, jangka sorong, kertas saring dan kantung selofan.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Lactobacillus plantarum* yang dibeli dari UGM (Universitas Gadjah Mada), bakteri indikator *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*), MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), NaOH (Merck), aquades, dan spiritus, Ammonium sulfat, Bovin Serum Albumin (BSA), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor, yaitu konsentrasi inokulum (K) dan lama fermentasi (F). Percobaan ini dilakukan dengan 2 kali ulangan. Kombinasi perlakuan konsentrasi inokulum dan lama fermentasi ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pengaruh variasi konsentrasi inokulum dan lama fermentasi

<b>K</b>	<b>F</b>	<b>Fase tengah logaritmik (F<sub>1</sub>)</b>	<b>Fase akhir logaritmik (F<sub>2</sub>)</b>	<b>Fase tengah stationer(F<sub>3</sub>)</b>
1% (K <sub>1</sub> )		K <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	K <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> F <sub>3</sub>
5% (K <sub>2</sub> )		K <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> F <sub>3</sub>
10% (K <sub>3</sub> )		K <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	K <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	K <sub>3</sub> F <sub>3</sub>

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi inokulum dan lama fermentasi sedangkan untuk variabel terikatnya adalah aktivitas antibakteri bakteriosin. Adapun proses penelitian dilakukan secara deskriptif dengan dua tahap yaitu pada tahap pertama bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap produksi bakteriosin. Variasi konsentrasi inokulum dibuat 1%, 5% dan 10% (v/v) dan variasi lama fermentasi selama 24 jam, 28 jam dan 32 jam. Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan.

Pada tahap kedua yaitu purifikasi bakteriosin menggunakan amonium sulfat dan dialisis menggunakan kantung selofan. Bakteriosin yang telah dipurifikasi diuji aktivitas antibakteri menggunakan bakteri indikator yaitu *Escherichia coli*

dan *Staphylococcus aureus* untuk diamati zona hambatnya. Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi Sampel
2. Pembuatan Media *Lactobacillus plantarum*
3. Regenerasi Bakteri dan Pembuatan Inokulum
4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri
5. Proses Produksi Bakteriosin
6. Purifikasi Parsial menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis
7. Penentuan Konsentrasi Protein
8. Uji Aktivitas Bakteriosin
9. Analisis Data

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat (Widarta, 2013)

Alat yang digunakan untuk menginokulasi bakteri seluruhnya dicuci bersih. Kemudian Erlenmeyer dan tabung reaksi dibungkus menggunakan plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C.

#### 3.5.2 Pembuatan Media *Lactobacillus plantarum*

Isolat *Lactobacillus plantarum* ditumbuhkan pada media MRSA dan MRSB. Media MRSA (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*) dibuat dengan menimbang 6,82 gram MRSA kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan media MRSB (*deMan, Rogosa and Sharpe Broth*) dibuat dengan menimbang 5,515 gram MRSB

kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades. Seluruh media kemudian dipanaskan sampai mendidih dan dihomogenkan menggunakan stirrer. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi.

### **3.5.3 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum* (L.F. Coelho, 2011)**

Biakan *Lactobacillus plantarum* diambil sebanyak dua ose dan dimasukkan kedalam media MRSA, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. *Lactobacillus plantarum* yang telah diregenerasi digunakan untuk pembuatan stok inokulum. Tahap selanjutnya pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dengan cara dua ose biakan *Lactobacillus plantarum* dipindahkan kedalam 100 mL media MRSB, kemudian di goyang dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 18 jam sampai fase eksponensial pada suhu 35°C.

### **3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri (Setianingsih, 2010)**

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan dari bakteri *Lactobacillus plantarum* khususnya pada fase stationer sebagai dasar penentu lama waktu inkubasi produksi bakteriosin. Pembuatan kurva pertumbuhan diawali dengan menginokulasikan inokulum *lactobacillus plantarum* sebanyak 2% kedalam Erlenmeyer yang berisi media MRSB sebanyak 200 mL secara aseptis. Pertumbuhan bakteri diamati dengan cara memipet 4 mL suspensi bakteri dan dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) berdasarkan nilai absorbansi setiap 2 jam (waktu inkubasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22 sampai 40 jam). Pengukuran dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 600 nm. Pengenceran dilakukan jika OD mendekati 1 atau lebih dari 1

untuk menghindari penyimpangan data dikarenakan sampel yang terlalu pekat. Nilai absorbansi (A) dikalikan dengan faktor pengenceran.

$$OD = A \text{ (nilai Absorbansi)} \times FP \text{ (Faktor Pengenceran)} \dots \dots \dots (3.1)$$

### 3.5.5 Produksi Bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum* (Ogunbanwo, dkk., 2003)

Penghitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode *total plate count* (TPC). Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam cawan petri yang berisi media MRSA. Cawan petri digoyang-goyang hingga merata dan didiamkan hingga membeku kemudian diinkubasi dengan posisi terbalik selama 48 jam pada suhu 37°C. Cara menghitung, dipilih cawan petri yang mempunyai koloni antara 30-300.

$$\text{Perhitungan jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{f_p} \text{ cfu} \dots \dots \dots (3.2)$$

Isolat *Lactobacillus plantarum* diinokulasi kedalam 100 mL media MRSB dengan konsentrasi inokulum 1%, 5% dan 10% kemudian masing-masing diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, 28 jam dan 32 jam. Selanjutnya pemanenan dilakukan dengan cara kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan bebas sel yang diperoleh dikondisikan pada pH 7 menggunakan NaOH 1N. Selanjutnya supernatan bakteriosin netral diuji antagonistik dan dimurnikan menggunakan ammonium sulfat.

### 3.5.6 Purifikasi Parsial menggunakan Ammonium Sulfat (Ogunbanwo, dkk., 2003)

Purifikasi (pemurnian) parsial bakteriosin dilakukan pada supernatan antimikroba netral yang berasal dari *Lactobacillus plantarum*. Serbuk ammonium sulfat ditambahkan dengan derajat kejenuhan 60% yaitu sebanyak 36,1 gram dengan sedikit demi sedikit kedalam supernatant antimikroba netral untuk mendapatkan endapan protein, kemudian dihomogenkan secara perlahan menggunakan *stirrer* pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu supernatant dipindahkan ke tabung sentrifus, kemudian dilakukan sentrifugasi 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, supernatan dibuang dan didapatkan presipitat bakteriosin. Presipitat bakteriosin kasar tersebut dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M pH netral (perbandingan 1:1) untuk menjaga dari kerusakan enzim. Selanjutnya dilakukan dialisis untuk menghilangkan protein dari kandungan garamnya (Rachmania, 2017).

Dialisis dilakukan dengan cara kantong selofan dengan ukuran 14 KDa dididihkan selama 15 menit dalam 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,5 gr dalam 50 ml) selanjutnya dididihkan dengan 50 Mm EDTA ( 0,73 gr dalam 50 ml) untuk mencegah hilangnya aktivitas molekul-molekul yang didialisis. Setelah dingin, kantong selofan direndam dengan aquades kemudian diikat salah satu ujungnya menggunakan benang hingga membentuk kantung. Selanjutnya dimasukkan presipitat bakteriosin kasar yang telah ditambahkan dengan buffer fosfat 0,2 M kedalam kantong selofan dan ujung yang satunya diikat lagi kemudian direndam dalam larutan buffer fosfat 0,05 M. Proses tersebut dilakukan di atas *stirrer* pada suhu 4°C dan dialisis dilakukan selama 24 jam. Selanjutnya ekstrak kasar bakteriosin dilakukan pengukuran

konsentrasi protein dengan metode biuret menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda = 550$  nm.

### **3.5.7 Penentuan Konsentrasi Protein (Martono, 2013)**

#### **3.5.7.1 Pembuatan Kurva Standar**

Larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1mg/ml dalam 10 mL aquades. Kemudian dipipet masing-masing sebanyak 1 mL dan ditambahkan 4 mL reagen biuret. Dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansi masing-masing larutan dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  550 nm. Setelah diperoleh kurva standar dilakukan pengukuran protein bakteriosin.

#### **3.5.7.2 Analisis Konsentrasi Protein Bakteriosin Metode Biuret**

Sampel bakteriosin diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml. Campuran larutan ini dihomogenkan dengan vortex. Dengan demikian maka sampel mengalami pengenceran 10x. Kemudian dari larutan yang telah diencerkan, diambil 1 ml dan ditambahkan 4 mL reagen biuret, dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kompleks berwarna yang terbentuk diukur absorbansinya pada  $\lambda$  550 nm. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimikroba.

### **3.5.8 Uji Aktivitas Antimikroba**

#### **3.5.8.1 Pembuatan Media Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli***

Media NA (*Nutrien Agar*) dibuat dengan cara diambil sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades. NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 1,8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades hangat menggunakan gelas kimia, kemudian di

panaskan menggunakan hotplate sampai mendidih. Dituang ke dalam Erlenmeyer yang ditutup dengan kapas steril. Media tersebut disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 psi. Ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu 40-45<sup>0</sup>C.

#### **3.5.8.2 Regenerasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Muhibah, 2013)**

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil satu ose kemudian digoreskan pada media NA (*Nutrien Agar*) miring secara aseptik. Tabung didekatkan ke api saat menggoreskan bakteri. Tabung kemudian ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.

#### **3.5.8.3 Pembuatan inokulum *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Silaban, 2009)**

Diambil satu ose bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kawat ose steril, lalu ditanamkan pada media Nutrien Agar miring dengan cara menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 18-24 jam. Untuk pembuatan stok kultur bakteri *Escherichia coli* dilakukan cara yang sama seperti pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri *Escherichia coli* yang digunakan sebanyak 7,8 x 10<sup>8</sup> cfu yang setara dengan OD 0,27 dan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan sebanyak 2,79 x 10<sup>8</sup> cfu setara dengan OD 0,2.

#### **3.5.8.4 Uji Aktivitas Antibakteri (Fitriyah, 2015)**

Uji antibakteri dilakukan berdasarkan metode uji Kirby-Bauer dengan menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas *whatman* dengan diameter 5 mm. Secara aseptik kertas cakram steril direndam dalam 50 µl ekstrak sampel bakteriosin selama 30 menit. Kemudian kertas cakram diambil dengan

pinset steril dan diletakkan diatas medium uji aktifitas antibakteri (Medium padat NA dalam cawan petri). Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Diamati zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram. Pengujian setiap isolat yang didapat dilakukan tiga kali pengulangan.

Zona hambat diukur dengan menggunakan penggaris untuk menentukan aktivitas bakteri. Luas zona hambat ditentukan dengan rumus (Simarmata, 2007):

$$Lz = Lav - Ld$$

Keterangan:

Lz = Luas zona hambat (mm)

Lav = Luas keseluruhan zona hambat (mm)

Ld = Luas diameter kertas cakram (mm)

Hasil dari pengukuran zona hambat dibandingkan dengan kriteria kekuatan daya hambat bakteri. Kriteria daya hambat bakteri yang digunakan adalah kuat (zona hambat > 6 mm), sedang (zona bening 3-6 mm), lemah (0-3 mm) (Pan, dkk., 2009).

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah menggunakan Two Way Analisa Varian (ANOVA) dengan menggunakan SPSS 18. Data hasil penelitian disusun dalam tabel dan grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan hasil pengamatan yang ada.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap produksi antibakteri bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum*. Adanya bakteriosin didalam supernatan antimikroba ditentukan berdasarkan hasil uji zona hambat terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Cara bakteriosin dalam melawan mikroorganisme yaitu dengan cara memberikan efek bakteriostatik, bakterisidal ataupun bakterilisis. Sifat bakteriostatik yaitu menghambat pertumbuhan maupun replikasi mikroorganisme tetapi tidak menyebabkan kematian. Sifat bakterisidal yaitu menyebabkan kematian mikroorganisme, sedangkan sifat bakterilisis yaitu menyebabkan lisis sel mikroorganisme (Gonzales, 1996). Supernatan bakteriosin yang efektif dalam menghambat bakteri indikator dilanjutkan dengan purifikasi parsial menggunakan ammonium sulfat untuk mendapatkan bakteriosin murni tanpa adanya pengaruh asam-asam organik. Selanjutnya bakteriosin yang sudah dimurnikan di uji aktivitas antimikroba menggunakan difusi cakram.

#### 4.1 Pembuatan Media

Media pertumbuhan bakteri adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang digunakan oleh bakteri untuk tumbuh dan berkembangbiak. Bakteri yang telah tercukupi nutrisinya akan tumbuh dengan cepat dan diawali dengan peningkatan ukuran komponen penyusun sel bakteri. Media berfungsi sebagai tempat tinggal, sumber makanan dan penyedia nutrisi bagi bakteri yang akan dibiakkan. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Lactobacillus*

*plantarum* adalah media MRSA dan MRSB, sedangkan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* adalah media NA dan NB. Menurut Sinea (2017) media MRSA merupakan medium selektif bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Media MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*) dan MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) mengandung protein yang tinggi seperti pepton, ekstrak daging, tripton dan polysorbate sehingga dapat menghasilkan populasi sel bakteri yang tinggi dan bakteriosin yang lebih banyak (Novirisandi, 2012). Media MRSA digunakan untuk regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum* dan media MRSB digunakan untuk membiakkan bakteri *Lactobacillus plantarum* dalam jumlah yang besar dan sebagai stok inokulum. Menurut Oktaviani (2014) jenis sumber karbon maupun sumber nitrogen yang digunakan pada media produksi akan mempengaruhi laju pertumbuhan sel BAL dan berpengaruh terhadap metabolisme produksi bakteriosin.

Media NA (*Nutrien agar*) dan NB (*Nutrien Broth*) merupakan media sederhana yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme yang tidak selektif. Media ini mengandung ekstrak beef dan pepton yang merupakan sumber protein, nitrogen, vitamin serta karbohidrat yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang (Indan, 2003). Semua media yang telah dipersiapkan disterilisasi menggunakan *autoclave*. Prinsip dari *autoclave* adalah mensterilkan berbagai macam alat dan bahan menggunakan uap air panas bertekanan 2 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Hendrati, 2013).

## 4.2 Regenerasi Bakteri *Lactobacillus plantarum*

Isolat *Lactobacillus plantarum* penghasil bakteriosin yang digunakan harus disimpan di dalam lemari pendingin yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri menuju ke fase kematian. Bakteri yang akan digunakan untuk produksi bakteriosin harus selalu diregenerasi terlebih dahulu agar bakteri berada pada fase pertumbuhan atau fase produktifnya. Menurut Mas'ud (2011) peremajaan bakteri merupakan hal penting yang harus dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri yang baru dan muda sehingga dapat berkembangbiak dengan baik dan dapat optimal ketika digunakan proses fermentasi. Proses regenerasi bakteri dilakukan didalam laminar yang sebelumnya telah disterilkan menggunakan alkohol, kemudian ujung kawat ose dibakar sampai pijar menggunakan bunsen yang bertujuan untuk mematikan mikroorganisme yang menempel pada jarum ose (Waluyo,2011). Regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan media MRSA miring yang di *streak* dua ose isolat bakteri kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Menurut Khairiyah (2014) Regenerasi isolat *Lactobacillus plantarum* dilakukan menggunakan media MRSA selama 48 jam untuk memberikan nutrisi dan menumbuhkan bakteri, pada jam ke-48 bakteri *Lactobacillus plantarum* mulai tumbuh pada media padat MRSA, pada kondisi ini bakteri siap dipanen dan diinokulasikan kedalam media MRSB untuk pembuatan inokulum.

### 4.2.1 Pembuatan Inokulum

Inokulum bakteri digunakan sebagai starter dalam suatu proses fermentasi. Pembuatan inokulum dilakukan menggunakan media MRSB dan secara aseptis di dalam *Laminar air flow* untuk meminimalisir kontaminasi dari bakteri lain.

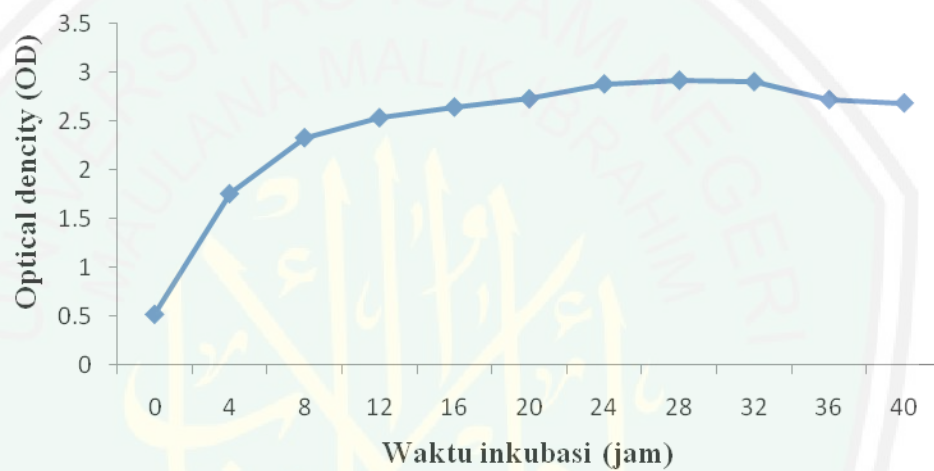
Inokulum dibuat dengan cara menginokulasi 2 ose isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* kedalam 300 ml media MRSB dan selanjutnya di *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 18 jam. Hal ini sesuai dengan penelitian Hariani (2013) Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara menginokulasikan sebanyak 2 ose hasil peremajaan bakteri *Lactobacillus plantarum* DJ3 ke dalam 25 ml media MRSBkemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm sampai fase logaritmik. Pada jam ke 18 bakteri berada pada fase logaritmik yaitu bakteri akan memulai untuk pembelahan sel secara cepat dan stabil. Pada fase ini inokulum siap digunakan sebagai kultur kerja atau starter untuk preses fermentasi.

#### 4.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan dari bakteri *Lactobacillus plantarum* sehingga dapat digunakan sebagai patokan untuk menentukan waktu fermentasi terbaik selama produksi senyawa antibakteri bakteriosin. Kurva pertumbuhan menunjukkan siklus perkembangbiakan dari bakteri yang ditandai dengan meningkatnya nilai kekeruhan (densitas) seiring dengan lamanya waktu inkubasi.

Empat fase siklus pertumbuhan bakteri menurut Todar (2009) adalah (1) Fase Adaptasi, yakni fase dimana setelah inokulasi sel kedalam media tumbuh, bakteri didalamnya relatif tetap atau tidak berubah untuk sementara waktu (2) Fase Eksponensial (logaritmik) adalah fase pertumbuhan yang seimbang dimana semua sel-sel membelah diri secara teratur melalui pembelahan biner (3) Fase Stasioner, tidak dapat ditentukan apakah beberapa sel telah mati dan sejumlah sel-sel lainnya sedang membelah diri, selama fase stasioner bakteri menghasilkan

metabolit sekunder, seperti antibiotik melakukan metabolit sekunder (4) Fase Kematian, dimana terjadi penurunan terhadap populasi sel hidup atau bakteri mengalami kematian. Kurva pertumbuhan bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 4.1 berikut:



Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan bakteri *Lactobacillus plantarum*

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri *Lactobacillus plantarum* tidak mengalami fase lag. Fase lag atau fase adaptasi adalah fase untuk menyesuaikan diri dengan substrat dan kondisi lingkungan di sekitarnya. Cepatnya fase adaptasi dapat dipengaruhi oleh kultur *Lactobacillus plantarum* ketika diinokulasikan kedalam media MRSB masih berada pada fase logaritmik, sehingga bakteri *Lactobacillus plantarum* tidak membutuhkan waktu lama untuk beradaptasi dalam media baru dan langsung melakukan aktivitasnya.

Selanjutnya fase logaritmik atau fase eksponensial di mana pertumbuhan jumlah bakteri berlangsung sangat cepat dimulai pada jam ke-0 hingga jam ke-24, pada fase ini satu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Hal ini sesuai dengan penelitian Hariani (2013) fase logaritmik ditandai dengan bertambahnya jumlah populasi yang signifikan dari sel bakteri. Fase selanjutnya yakni fase tetap (stasioner) yang terjadi pada jam ke 24 – 34 waktu inkubasi. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan yang konstan antara bakteri yang hidup dan yang mati. Reiny (2012) menyebutkan bahwa pada fase stasioner akan terjadi penumpukan metabolit hasil aktivitas metabolisme sel dan kandungan nutrisi pada media mulai habis. Akibatnya, akan terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi sehingga beberapa sel mati dan lainnya akan tetap tumbuh dan jumlah sel menjadi relatif konstan.

Hasil metabolisme mulai dari fase log sebagian besar berupa asam laktat yang ditandai dengan penurunan nilai pH. Metabolit lain yang diproduksi selama pertumbuhan bakteri asam laktat adalah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ),  $CO_2$ , diasetil dan bakteriosin. Produksi bakteriosin dengan maksimal terjadi selama fase stasioner, hal ini sesuai dengan Dride dkk (2006) bahwa pada awal fase stasioner bakteri asam laktat mengalami modifikasi enzimatik yaitu prebakteriosin akan berubah menjadi bakteriosin yang aktif, sehingga lama inkubasi BAL sebaiknya dilakukan hingga fase stasioner berakhir, yakni pada jam ke-24 hingga jam ke-32, apabila waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan aktivitas bakteriosin

menurun yang disebabkan oleh terbebasnya protease dari sel autolisis akibat bakteriosin yang mudah didegradasi.

#### 4.4 Produksi Bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*

Produksi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* secara fermentasi diawali dengan pembuatan inokulum kerja sebanyak 250 ml kemudian dishaker selama 18 jam yang mana bakteri berada pada fase logaritmik. Hal ini sesuai dengan penelitian Fauziah (2013) fase pertumbuhan logaritmik terjadi pada jam ke 18 inkubasi, Selama fase log sel membelah terus menerus konstan dengan kecepatan pertumbuhan yang tinggi. Selanjutnya diukur nilai OD (*Optical Density*) untuk menentukan jumlah populasi mikroba antara 30 – 300 koloni. Bila jumlah populasi kurang dari 30 koloni maka akan menghasilkan penghitungan yang kurang teliti secara statistik, namun bila lebih dari 300 koloni akan menghasilkan hal yang sama karena terjadi persaingan diantara koloni. Hal ini sesuai dengan Pratiwi (2008) metode penghitungan sel di dasarkan pada asumsi bahwa bakteri hidup akan tumbuh, membelah, dan memproduksi 1 koloni tunggal. Metode pengukuran ini dilakukan pada *plate* dengan jumlah koloni berkisar 25 - 250 atau 30 – 300. Sehingga pada hasil penelitian didapatkan nilai *optical density* (OD) sebesar 0,6 atau setara dengan jumlah sel bakteri sebanyak  $63,5 \times 10^7$  Cfu/ml.

Hasil inokulum diencerkan menjadi OD 0,6 sesuai dengan perhitungan jumlah sel bakteri dan divariasikan konsentrasi 1%, 5% dan 10% selama 24 jam, 28 jam dan 32 jam masing-masing kedalam 25 ml media MRSB. Filtrat hasil fermentasi dipisahkan dari endapan selnya dengan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit 4°C. Sentrifugasi dilakukan pada suhu yang dingin agar mencegah terjadinya denaturasi protein akibat suhu yang terlalu

tinggi. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian disaring dan diukur nilai pHnya. Cairan yang terpisah di bagian atas setelah sentrifugasi merupakan supernatan bebas sel atau ekstrak kasar, ekstrak kasar berada pada kondisi asam yaitu antara pH 3,7-3,9. Asam organik tersebut merupakan asam laktat karena *Lactobacillus plantarum* adalah bakteri asam laktat homofermentatif yang hanya menghasilkan asam laktat dari proses fermentasi karbohidrat (Ray dan Bhunia, 2007).

Asam-asam organik yang dihasilkan dalam ekstrak kasar antimikroba tersebut dapat menutupi aktivitas bakteriosin yang terbentuk dalam menghambat bakteri indikator pada uji antagonistik. Sehingga perlu dilakukan penambahan buffer NaOH 0,1 N sampai ekstrak antimikroba mencapai kondisi pada pH 6,2. Penetralkan asam laktat dengan NaOH menghasilkan ekstrak yang bersifat netral, dengan reaksi sebagai berikut:



Penambahan buffer NaOH bertujuan untuk mengurangi pengaruh asam organik dalam supernatan antimikroba dan diharapkan dapat mengoptimalkan aktivitas bakteriosin yang terbentuk.

Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Djati (2012) yang telah melakukan penelitian bakteriosin menggunakan pH yakni berkisar antara 5,8-6,2. Hal tersebut dilakukan agar asam-asam organik yang terkandung di dalam supernatan bebas sel menjadi netral sehingga tidak mengganggu aktivitas penghambatan yang dilakukan oleh supernatan netral yang nantinya akan digunakan untuk tahapan selanjutnya yakni purifikasi parsial yang menggunakan garam untuk mengikat protein yang terkandung di dalam supernatan.

#### 4.4.1 Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi terhadap Produksi Bakteriosin

Karakteristik BAL yang terpenting adalah kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antimikroba yang salah satunya adalah senyawa bakteriosin. Produksi bakteriosin yang tinggi identik dengan aktivitas antibakteri yang tinggi. Adanya aktivitas bakteriosin dari supernatan *Lactobacillus plantarum* ditandai dengan munculnya zona hambat disekitar kertas cakram yang telah direndam didalam ekstrak bakteriosin kemudian zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (mm). Rata-rata zona hambat yang terbentuk didalam penelitian ini dapat dilihat dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi inokulum (%)	Lama fermentasi (jam)	Rata-rata zona hambat (mm)
1	24	3,0 <sup>b</sup>
	28	1,6 <sup>a</sup>
	32	2,4 <sup>ab</sup>
5	24	1,9 <sup>b</sup>
	28	2,6 <sup>a</sup>
	32	2,4 <sup>ab</sup>
10	24	3,0 <sup>b</sup>
	28	3,1 <sup>a</sup>
	32	5,0 <sup>ab</sup>

Keterangan: Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan hasil yang nyata ( $P \leq 0,05$ )

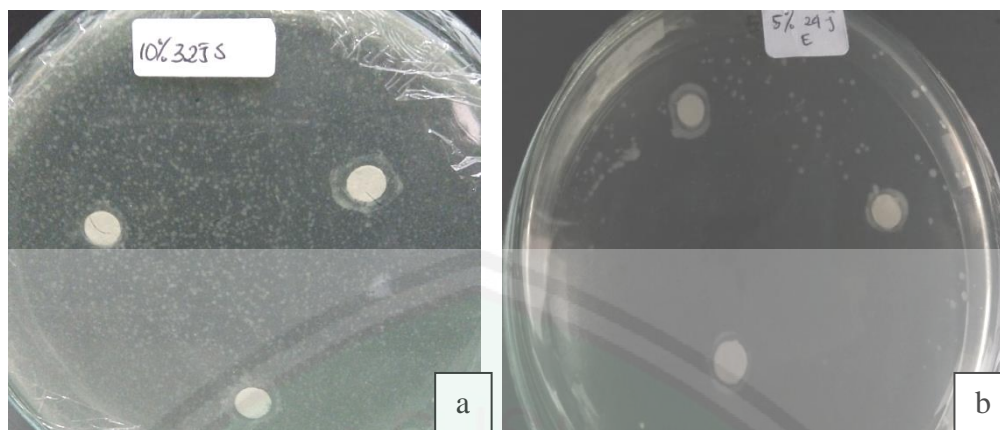
Berdasarkan Tabel 4.1. Aktivitas bakteriosin tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat dari rata-rata zona hambat yang terbentuk sebesar 5,0 mm. Sedangkan aktivitas bakteriosin yang menghambat pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi inokulum (%)	Lama fermentasi (jam)	Rata-rata zona hambat (mm)
<b>1</b>	24	3,2 <sup>a</sup>
	28	1,8 <sup>a</sup>
	32	2,2 <sup>a</sup>
<b>5</b>	24	4,2 <sup>a</sup>
	28	2,0 <sup>a</sup>
	32	2,5 <sup>a</sup>
<b>10</b>	24	1,5 <sup>b</sup>
	28	2,5 <sup>b</sup>
	32	3,5 <sup>b</sup>

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P \leq 0,05$ )

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa diameter zona hambat bakteriosin terhadap *Escherichia coli* tertinggi yaitu sebesar 4,2 mm. Aktivitas antibakteri bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* terhadap kedua bakteri indikator mencapai angka tertinggi pada bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pada variasi konsentrasi inokulum 10% selama 32 jam. Sedangkan aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli* tertinggi pada variasi konsentrasi inokulum 5% selama 24 jam. Hal ini dapat terjadi karena ketersediaan glukosa yang masih tinggi pada akhir fase stationer atau awal fase kematian sehingga senyawa antimikroba yang terbentuk juga besar.



Gambar 4.2 Luas zona hambat antibakteri bakteriosin terhadap bakteri (a) *Staphylococcus aureus* dan (b) *Escherichia coli*

Menurut Pan (2009) Diameter zona hambat dengan nilai 0 - 3 mm termasuk dalam kategori lemah, zona hambat antara 3 – 6 mm termasuk kategori sedang dan luas zona hambat lebih dari 6 mm termasuk dalam kategori kuat. Sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* terhadap bakteri indikator *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* termasuk dalam kategori sedang.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Harianie (2013) bahwa *Lactobacillus plantarum* menunjukkan sifat antibakteri dari bakteriosin yang lebih kuat terhadap bakteri-bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* sebesar 5,33 mm dibandingkan *Escherichia coli* sebesar 4 mm. Bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri Gram positif sehingga mampu melewati dinding sel dan melakukan aktivitas antimikroba nya terhadap bakteri Gram positif lain akibat adanya peptida-peptida kationik. Hal yang sama dilakukan oleh Hendriani, dkk (2009) yang telah melakukan penelusuran antibakteri bakteriosin dari bakteri asam laktat dalam *yoghurt* asal kabupaten

bandung barat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menghasilkan zona hambat sebesar 13,50 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan sebesar 10,15 mm terhadap *Escherichia coli*. Penelitian yang telah dilakukan Goraya (2013) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri bakteriosin yang diproduksi oleh BAL terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 9 mm dan terhadap bakteri *Escherichia coli* sebesar 5 mm.

Menurut Syahniar (2009) bakteri Gram positif mempunyai asam teikoat yang merupakan reseptor dari bakteriosin. Pada awalnya molekul bakteriosin akan menempel pada membran sel sehingga akan mengganggu potensial membran yang mengakibatkan ketidakstabilan membran sitoplasma dan terjadi pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui gaya gerak proton yang terganggu. Membran sel yang telah terbentuk lubang akan terjadi perubahan gradien potensial membran serta pelepasan molekul intraseluler ataupun masuknya substansi ekstraseluler. Pertumbuhan sel menjadi terhambat dan mempercepat kematian pada sel.

Mekanisme kerja bakteriosin dalam pembentukan pori yaitu harus ada interaksi dengan membran sitoplasma yang mengandung lipid bermuatan negatif yang merupakan reseptor utama bakteriosin dalam proses pembentukan pori. Interaksi elektrostatik antara bakteriosin yang bersifat hidrofobik bermuatan positif dengan gugus fosfat yang bersifat negatif dari membran sel adalah tahap awal pengikatan bakteriosin dengan membran target. Bagian hidrofobik bakteriosin menembus kedalam membran sehingga membentuk pori (Suparjo, 2008).

Bakteriosin Gram positif merupakan senyawa aktif membran yang bekerja melalui pembentukan pori pada membrane sel target, menghambat pembentukan enzim dan pertumbuhan spora. Pembentukan pori pada membran sel merangsang permeabilitas membran yang dapat mengganggu keseimbangan ADP (Adenosin diphospat) /ATP (Adenosin Tri Phospat) intraselular akibat kebocoran fosfat inorganik, mengurangi daya gerak proton, memungkinkan perembesan ion ( $K^+$  dan  $Mg^{2+}$ ), asam amino (asam glutamate dan lisin). Hal ini menyebabkan terjadinya kematian terhadap sel, PMF (*Proton Motif Force*) merupakan gradien elektrokimia diatas membran sitoplasma yang terdiri atas gradien pH dan juga potensial membran. PMF bertugas memandu sintesis ATP dan mengakumulasi ion dan metabolit lainnya (Gajic, 2003).

Berdasarkan hasil analisis ragam *two way annova* menunjukkan bahwa pada uji aktivitas antibakteri bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan nilai signifikansi  $<0,05$  yang artinya ada interaksi antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin. Analisis lebih lanjut menunjukkan hasil aktivitas antibakteri bakteriosin berbeda nyata pada perlakuan inkubasi 24 jam dengan 28 jam dan perlakuan inkubasi 28 jam tidak berbeda nyata dengan 32 jam. uji aktivitas antibakteri bakteriosin terhadap *Escherichia coli* menunjukkan nilai signifikansi  $>0,05$  yang artinya tidak ada interaksi antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin. Analisis lebih lanjut menunjukkan hasil aktivitas antibakteri bakteriosin tidak berbeda nyata.

#### 4.5 Purifikasi Parsial menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis

Proses purifikasi bakteriosin diawali oleh proses purifikasi parsial dengan menggunakan amonium sulfat yang ditambahkan kedalam supernatan bakteriosin. Hal ini bertujuan untuk memisahkan protein-protein yang berada di dalam supernatan khususnya protein yang memiliki aktivitas antimikroba dapat berikatan dengan garam ammonium sulfat sehingga akan terbentuk endapan protein yang mengapung di atas larutan. Supernatan bakteriosin yang dimurnikan yaitu variasi inokulum 5% selama 24 jam karena efektif membunuh semua bakteri indikator dari awal pengujian dan berdasarkan kurva pertumbuhan selama 24 jam sel-sel bakteri *Lactobacillus plantarum* dapat berkembangbiak secara optimal sehingga dapat menghasilkan senyawa antibakteri bakteriosin dengan optimal pula.

Penambahan ammonium sulfat kedalam supernatan netral sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kondisi dingin. Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan adalah 60%. Menurut Ogunbanwo (2013) bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* F1 dan *Lactobacillus brevis* OG1 mengikuti pengendapan ammonium sulfat 60% dengan peningkatan aktivitas protein spesifik 9.4 dan 5.2 AU/ $\mu\text{g}$ . Hasil yang didapatkan pada purifikasi parsial ini disebut presipitat *plantaricin*. Tahap purifikasi berikutnya adalah dialisis dalam kondisi dingin (4°C).

Proses dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam amonium sulfat dan molekul berukuran kecil lainnya yang masih terkandung dalam presipitat *plantaricin*. Molekul *plantaricin* yang berukuran lebih besar akan terperangkap didalam membran dialisis, sedangkan garam amonium sulfat akan berdifusi keluar melewati membran dialisis. Molekul zat terlarut akan berpindah dari larutan yang

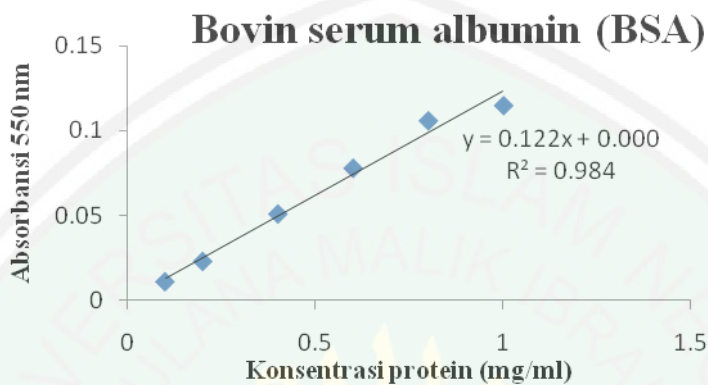
memiliki konsentrasi tinggi ke larutan yang memiliki konsentrasi rendah. Dialisis dilakukan dengan cara melarutkan endapan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dengan buffer fosfat 0,2 M yang berfungsi untuk melarutkan dan menjaga kestabilan protein bakteriosin. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan kedalam kantong selofan yang diikat atas dan bawah dengan sangat rapat. Selanjutnya, kantong selofan direndam dalam larutan buffer fosfat dengan konsentrasi 0,05 M sampai memenuhi sedikit diatas kantong selofan.

Dialisis dilakukan pada suhu dingin agar tidak terjadi penurunan kestabilan protein bakteriosin dan juga disertai dengan pengadukan kecepatan rendah menggunakan *magnetic stirrer* untuk mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari membran dialisis. Proses dialisis dilakukan selama 24 jam dengan pergantian buffer fosfat konsentrasi 0,05 M sebanyak 3 kali. Pergantian buffer setiap 8 jam dilakukan ketika larutan didalam kantong dan diluar kantong telah mencapai kesetimbangan, sehingga proses difusi dapat terus berjalan. Setelah 24 jam hasil dialisis yaitu bakteriosin murni disimpan di wadah steril untuk dilakukan uji protein dan uji aktivitas antibakteri.

#### **4.6 Konsentrasi Protein Bakteriosin**

Supernatan bakteriosin yang telah dipurifikasi selanjutnya diukur konsentrasi proteinnya. Pengujian protein dilakukan menggunakan metode biuret. Reaksi biuret yang terjadi yaitu warna ungu menunjukkan adanya 2 atau lebih ikatan peptida. Penentuan konsentrasi protein bakteriosin menggunakan kurva standart dari Bovin serum albumin (BSA) yang berfungsi untuk mengetahui absorbansi dan konsentrasi larutan protein. Pengukuran konsentrasi protein

selanjutnya dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm. Kurva standart protein dapat dilihat pada Tabel 4.2.



Gambar 4.3 Kurva standart protein bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum*

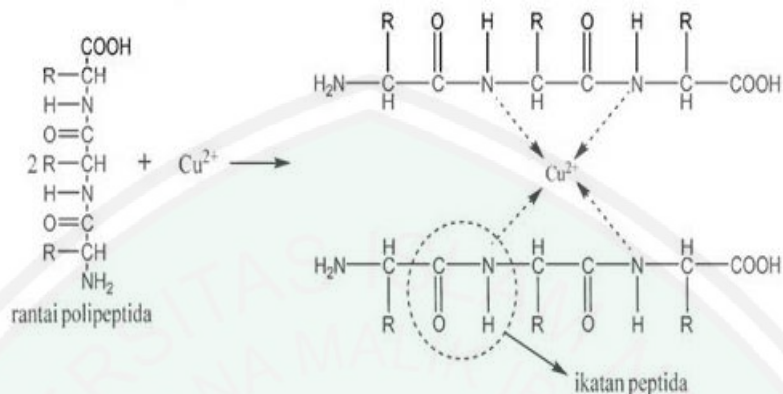
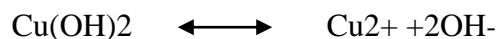
Berdasarkan kurva 4.3 dapat diketahui konsentrasi protein bakteriosin dari supernatan bebas sel dan ekstrak bakteriosin murni, sehingga dapat dilihat perbedaan konsentrasi protein dari kedua bentuk bakteriosin tersebut. Hasil pengukuran konsentrasi protein dari tahapan diatas dapat dilihat pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Kadar konsentrasi protein bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum*

Sampel	konsentrasi protein (mg/ml)
<b>Bakteriosin sebelum purifikasi</b>	35,03
<b>Bakteriosin setelah purifikasi</b>	0,262

Berdasarkan Tabel 4.3 diketahui bahwa konsentrasi protein pada supernatan bakteriosin lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak bakteriosin murni. Supernatan bakteriosin mempunyai nilai konsentrasi protein yang lebih tinggi karena diasumsikan masih bercampur dengan suspensi bakteri atau masih adanya media MRSB yang memiliki kandungan pepton dan *yeast ekstrak* yang tinggi (Bariyah, 2012). Sedangkan setelah proses dialisis terjadi penurunan konsentrasi protein sehingga dapat diasumsikan bahwa berkurangnya atau hilangnya pengaruh dari media MRSB yang digunakan selama proses dialisis berlangsung.

Bakteriosin yang terdapat pada bakteri *Lactobacillus plantarum* disebut plantarisin. Plantarisin merupakan salah satu jenis bakteriosin yang termasuk kelas II yang tahan panas. Bakteriosin kelas IIb merupakan bakteriosin yang terdiri dari dua buah peptida yang tidak termodifikasi karena mengandung dua peptida yang berbeda satu sama lain, terdapat dalam jumlah yang sama, membentuk pori pada membran sel target, dan mengganggu gradien proton dari sel target (Todorov, 2009). Reaksi biuret merupakan reaksi warna yang umum untuk gugus peptida (-CO-NH-) dan protein. Reaksi ini positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna ungu karena terbentuk senyawa kompleks antara  $\text{Cu}^{2+}$  dan N dari molekul ikatan peptida. Ikatan peptida merupakan ikatan kovalen yang terbentuk antara dua molekul asam amino ketika atom karbon pada gugus karboksil bereaksi dengan atom N pada gugus amina dari asam amino yang lain dengan melepas molekul air. Banyaknya asam amino yang terikat pada ikatan peptida mempengaruhi warna reaksi ini. Reaksi biuret dengan protein dapat dilihat pada Gambar 4.2 :



Gambar 4.4 Reaksi biuret dengan senyawa protein (Primafandi, 2011).

Ikatan Peptida dan gugus karboksil pada asam amino dapat dilepaskan dengan proses dekarboksilasi dan menghasilkan suatu amina. Sintesis peptida pada dasarnya mereaksikan gugus  $-\text{COOH}$  dengan gugus  $-\text{NH}_2$ . Sifat peptida dapat ditentukan oleh gugus  $-\text{NH}_2$ , gugus  $-\text{COOH}$  dan gugus R. sifat asam dan basa pada peptida ditentukan oleh gugus  $-\text{NH}_2$ , dan  $-\text{COOH}$ , namun pada peptida rantai panjang, gugus  $-\text{NH}_2$  dan  $-\text{COOH}$  tidak berpengaruh (Poedjiadi, 2012).

Konsentrasi protein yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* ini adalah sebesar  $0,262 \mu\text{g/ml}$ . Rajaram (2010) melaporkan bahwa konsentrasi protein dari bakteriosin asal *Lactobacillus lactis* adalah sebesar  $28,7 \text{ mg/ml}$ , Bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* IIA-IA5 adalah sebesar  $0,765 \text{ mg/ml}$  (Elfrida, 2014), Hal ini membuktikan bahwa perbedaan spesies dan strain *Lactobacillus* mempengaruhi karakteristik plantarisin yang dihasilkan (Saenz *dkk.*, 2009).

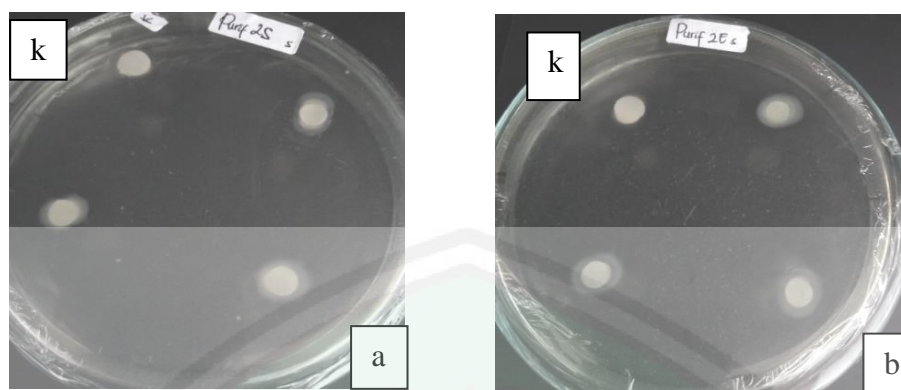
#### 4.7 Uji Aktivitas Bakteriosin

Ekstrak bakteriosin murni yang dihasilkan dari *Lactobacillus plantarum* mempunyai karakteristik protein yang hidrofobik. Selain itu, kebanyakan bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat adalah berbentuk kecil, tahan panas, termasuk peptida-peptida kationik dan mempunyai sifat hidrofobik (Jack dkk, 1995 Savadogo dkk., 2006). Bagian hidrofobik didalam molekul bakteriosin merupakan hal yang diperlukan untuk aktivitasnya dalam menghambat bakteri sensitif karena inaktivasi mikroorganisme oleh bakteriosin tergantung pada interaksi hidrofobik antara sel-sel bakteri dengan molekul-molekul bakteriosin (Parada dkk., 2007). Aktivitas penghambatan ekstrak bakteriosin murni terhadap masing-masing bakteri indikator ditunjukkan dengan rata-rata diameter zona hambat yang dapat dilihat pada Tabel 4.4 :

Tabel 4.4 Aktivitas penghambatan bakteriosin sebelum dan sesudah purifikasi

Bakteri Indikator	Sebelum Purifikasi		Setelah Purifikasi	
	Protein (mg/ml)	Zona Hambat (mm)	Protein (mg/ml)	Zona Hambat (mm)
<i>Stapylococcus aureus</i>	35,03	2,77	0,262	5.61
<i>Escherichia coli</i>		2.60		6.05

Diameter zona hambat untuk ekstrak bakteriosin setelah dipurifikasi menunjukkan hasil lebih besar dibanding sebelum purifikasi. Hal ini disebabkan tingginya peptida aktif dalam *plantaricin* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri indikator. Luas zona hambat bakteriosin setelah dipurifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.3:



Gambar 4.5 Luas zona hambat Antibakteri bakteriosin setelah dimurnikan terhadap bakteri (a) *Staphylococcus aureus* dan (b) *Escherichia coli*.

Luasnya zona hambat yang terbentuk terhadap *Escherichia coli* menunjukkan hasil lebih besar dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri Gram positif dapat efektif menghambat bakteri Gram negatif tanpa penambahan komponen aktif. Ray dan Bhunia (2008) menyatakan bahwa suatu strain yang sensitif terhadap bakteriosin dapat menjadi resisten, namun strain tersebut akan sensitif terhadap bakteriosin yang lain.

Penelitian Djati (2012) menunjukkan hasil zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* sebesar 8,12 mm sedangkan *Staphylococcus aureus* sebesar 7,27 sebelum dipurifikasi, hasil setelah dipurifikasi dan dialisis menunjukkan luas zona hambat meningkat yaitu sebesar 10,12 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan sebesar 10,79 terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian Marie (2012) yang melakukan purifikasi bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* menghasilkan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 17 mm sebelum dipurifikasi dan zona hambat bertambah luas setelah dipurifikasi yaitu

menjadi 22 mm. Sedangkan luas zona hambat yang dihasilkan bakteriosin terhadap *Escherichia coli* yaitu sebesar 13 mm dan mengalami penambahan luas zona menjadi 18 mm setelah dipurifikasi.

Bakteriosin merupakan senyawa protein antibakteri yang dapat mencegah strain-strain yang sensitif yakni bakteri Gram negatif dan Gram positif (Savadogo, 2004). Bakteriosin kasar yang dihasilkan dari tahap dialisis merupakan senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri patogen. Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk dilakukan oleh senyawa antimikroba dengan cara merusak dinding sel mikroba sehingga sel yang sedang tumbuh akan terlysis atau terurai, protein sel juga terdenaturasi dan terjadi perusakan sistem metabolisme di dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler (Pelczar dan Rheid, 1986).

#### 4.8 Tinjauan Bakteriosin dan Bakteri dalam Perspektif Islam

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif sehingga berpotensi sebagai biopreservasi/pengawetan bahan pangan. Protein bakteriosin dimurnikan menggunakan metode dialisis bertujuan untuk mendapatkan protein antimikroba yang mana memiliki zona hambat lebih besar dibanding sebelum dimurnikan. Hal ini menjelaskan bahwa segala sesuatu yang apabila difikirkan maka akan mendapat manfaat atau faedah seperti halnya bakteri yang sangat kecil sekalipun berpotensi sebagai pengawet makanan. Hal ini dijelaskan dalam Al-Qur'an Q.S An-nahl ayat 8 :

وَالْحَيْلَ وَالْبِغَالَ وَالْحَمِيرَ لِتَرْكَبُوهَا وَزِينَةً وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ ﴿٨﴾

*dan (Dia telah menciptakan) kuda, baghal, dan keledai, agar kamu menungganginya dan (menjadikannya) perhiasan. Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui.” (QS. An-Nahl : 8)*

Pada ayat diatas disebutkan “*Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui*” menunjukkan bahwa Allah telah menciptakan keberadaan bentuk-bentuk kehidupan yang manusia sebelumnya tidak mengetahui. Manusia masih mengungkap ayat Al-Qur’an tentang keberadaan adanya kehidupan itu, baru kemudian setelah alat mikroskop ditemukan, manusia mulai dapat melihat dengan mata penglihatannya tentang makhluk hidup yang terkecil. Makhluk terkecil yang tidak kasat mata itulah yang sering disebut mikroorganisme atau bakteri.

Adanya protein antimikroba yang dihasilkan beberapa jenis bakteri, berguna untuk melindungi bakteri penghasilnya dari bakteri lain yang bersifat merugikan. Protein antimikroba ini tidak hanya berguna bagi bakteri penghasilnya itu sendiri, namun dapat pula dimanfaatkan untuk keperluan manusia. Kurniawan (2012) menyebutkan bahwa bahwa protein antimikroba yang dihasilkan bakteri asam laktat memiliki potensi untuk dapat diaplikasikan sebagai bahan biopreservatif pada produk pangan, khususnya pangan dari produk peternakan yang memiliki pH rendah. Biopreservatif ini diharapkan dapat menggantikan penggunaan bahan-bahan pengawet sintetis yang diketahui dapat menimbulkan berbagai macam penyakit.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Bakteri *Lactobacillus plantarum* dapat menghasilkan senyawa antibakteri bakteriosin, produksi bakteriosin tertinggi ditandai dengan luas zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Rata-rata zona hambat tertinggi yaitu 5,0 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan 4,2 mm terhadap *Escherichia coli*.
2. Diameter zonahambat untuk ekstrak bakteriosin setelah dipurifikasi menunjukkan hasil lebih besar dibanding sebelum purifikasi. Hal ini disebabkan tingginya peptida aktif dalam *plantaricin* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri indikator yaitu sebesar 5,61 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan 6,05 mm terhadap *Escherichia coli*.

#### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk optimasi produksi bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* yang dipengaruhi oleh faktor nutrisi, suhu maupun media pengganti yang lebih murah sehingga didapatkan bakteriosin yang optimal. Serta perlu dilakukan Elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul dari bakteriosin yang telah diproduksi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anas, Mami, Henni Jamal Eddine Dan Kihal Mebrouk. 2008. Antimicrobial Activity Of *Lactobacillus* Species Isolated From Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus Aureus*. *World Journal Of Dairy And Food Sciences*. 3(2): 39-49.
- Arief, I.I. 2005. Karakteristik Dan Nilai Gizi Protein Daging Sapi Dark Firm Dry (Dfd) Hasil Fermentasi *Lactobacillus Plantarum* Yang Diisolasi Dari Daging Sapi. Laporan Akhir Kegiatan Penelitian Perguruan Tinggi Hibah Bersaing Xiii/I. Lembaga Penelitian Dan Pemberdayaan Masyarakat. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arief, I. I. 2011. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Daging Sapi Sebagai Probiotik Dan Identifikasinya Dengan Analisis Urutan Basa Gen 16s Rrna. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., A. V. Wright and A. Ouwehand (Editors). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. 3<sup>rd</sup> Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bachrudin, Z., Astuti, Dan Y.S. Dewi. 2000. Isolasi Dan Seleksi Mikroba Penghasil Laktat Dan Aplikasinya Pada Fermentasi Limbah Industri Tahu. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim Dan Bioteknologi. Mikrobiologi Enzim Dan Bioteknologi*.
- Barefoot, S.F. and Neetles, C.G., 1993. Antibiosis Revisited : Bacteriocins Produced By Dairy Starter Culture. *J. Dairy Sci.*, 76 : 2366-2379
- Bhunia, A. K., M. C. Johnson, B. Ray, and N. Kalchaanand. 1991. Mode Of Action Of Pediocin Ach From *Pediococcus Acidilactici* H On Sensitive Bacteria Strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70 : 1-25
- Bariyah, Khairul. 2012. Aktivitas Antimikrob Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* Terhadap Berbagai Bakteri Patogen Selama Penyimpanan Suhu Dingin. *Skripsi*. Bogor: Ipb
- Cartney, M.M. 1997. *Enzymes, Probiotics and Antioksidan*. New York: Mediterranean Synergy TM. Awareness Corporation. USA
- Cleveland, J., T.J. Motville, I.F. Nes, & M.L. Chikinda. 2001. Bacteriocin: Safe Natural Antimicrobials For Food Preservation. *J. Int J Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Coelho, L.F.C.J.B De Lima, C.M. Rodovalho, M.P. Bernando And J. Contiero. 2011. *Lactic Acid Production By New Lactobacillus Plantarum Lmism*<sup>^</sup>

*Grown In Molasses: Optimiztion Of Medium Composition.* Brazilian Journal Of Cjchemicalengineering.Vol 28(1): 27-36.

- Drude, D.,G. Fimland, Y. Hechard, L.M. McMullen &H.Prevoost. 2006. The Continuing story of class ii bacteriocins .J.Microbiol. Mol. Biol. Rev:562-582.
- Elfrida, Dewi Sihombing. 2014. Aktivitas Antimikrob Plantarisin asal *Lactobacillus plantarum* IIA-IA5 dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Daging Sapi.Tesis. Bogor: IPB.
- Fauziah,P.N. 2013. pengaruh laju pertumbuhan dan waktu generasi terhadap penghambatan pertumbuhan koloni klebsiella pneumoniae strain atcc 700603, ct1538 dan s941 oleh *lactobacillus bulgaricus* ks1 dalam soyghurt. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran.
- Fitriyah, Nikmatul, Mahendrata Purwa K, M. Afif Alfiyanto, Mulyadi, Nila Wahuningsih dan Joko Kismanto. 2013. “Obat Herbal Antibakteri Ala Tanaman Daun Binahong. Program Studi D-III Keperawatan”.Stikes Kususma Husada Surakarta.
- Gajic, O. 2003.Relationship between MDR preteins, bacteriocin production and proteolysis in Lactococcus lactis. *Disertation.* University of Groningen.Netherland.
- Gonzales,B.E.,E. Glaasker,E.R.S. Kunji,A.J.M.Driessen,J.E.SuarezandW.N. K. Onings.1996. Bactericidal Mode Of Action Of Plantaricin S.Appl. Environ. Microbiol. 62:2701-2709.
- Goraya, M., Ashraf, U.M., Ur-Rahman, S., Raza, A.,and Habib, A., 2013, Determination of antibacterial activity of bacteriocins of lactic acid producing bacteria, Journal of Infection and Molecular Biology, 1: 1-7
- Hariani, Lilik. 2013. Produksi Bakteriosin Oleh *Lactobacillus Plantarum* Dj3 Dan Aplikasinya Sebagai Pengawet Daging. *Alchemy.* Vol 4 No1.
- Hendrati, PM. 2013. Prinsip Sterilisasi menggunakan Autoclave.*Report/Community Services.* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Unsoed
- Hendriyani, R. 2009. Penelusuran Antibakteri Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Dalam *Yoghurt* Asal Kabupaten Bandung Barat Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian peneliti muda (litmud) unpad.
- Immanuel G, Bhagavath CMA, RajPI, Esak kiraj P, dan Palavesam A. 2007. Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and

*A. fumigatus* Fermented in Coir Waste and Sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*. Vol. 3(1)

- Indan. 2003. Mikrobiologi dan Parasitologi. Bandung: Citra Aditya. Bakti
- Irawati, E., (2011) Bakteri Homofermentatif, <http://www.blogspot.com/bakteri-homofermentatif-kamriantiramli.html>. Diakses tanggal 7 Maret 2017.
- Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 1416-1492.
- Jati, A. 2012. Produksi Bakteriosin Kasar *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1a5, 1b1 dan 2b2 Asal Daging Sapi Serta Aktivitas Antimikrobanya Terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Bogor : IPB
- Jenie, S.L., Dan Shinta E. Rini. 1995. Aktivitas Antimikroba Dari Beberapa Spesies *Lactobacillus* Terhadap Mikroba Patogen Dan Perusak Makanan. *Buletin Teknologi Dan Industri Pangan*, 7(2): 46-51.
- Khoiriyah, H., Puji Ardiningsih Dan Afgani Jayuska. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteri *Lactobacillus* Sp. Red<sub>4</sub>. Hal 7-12. Vol 3 (1).
- Kristanti N.D. 2001. Pemurnian Parsial Dan Karakterisasi Lipase Ekstraselular Dari Kapang R. *Oryzae* Tr 32 (*Tesis*). Bogor: Program Pascasarjana Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Kurniawan, Iqbal. 2005. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Buah Masak (Pepaya, Nanas, Pisang dan Salak). *Skripsi*. Yogyakarta: FTP: UGM.
- Kusmiati Dan A. Malik. 2002. Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri *Leuconostoc Mesenteroides* Pbac1 Pada Berbagai Media. *Makara, Kesehatan* Vol 6 (1) :1-6
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., dan Clark, D. P. 2012. *Brock Biology of Microorganisms 13th Edition*. Boston: Pearson Education Inc.
- Marie, K.P. 2012. Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Lp6SH Isolated from "Sha'a" a Maized- Based Traditionally Fermented Beverage from Cameroon. *International Journal of biology*. Vol 4 (2).
- Muhibbah, Rohmatin. 2011. Potensi *Lactobacillus Plantarum* Sebagai Probiotik Secara In Vitro (Kajian Ketahanan Terhadap Asam, Garam Empedu, Dan penghambatan Terhadap Bakteri Patogen). Malang: *Skripsi* Tidak

diterbitkan. Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

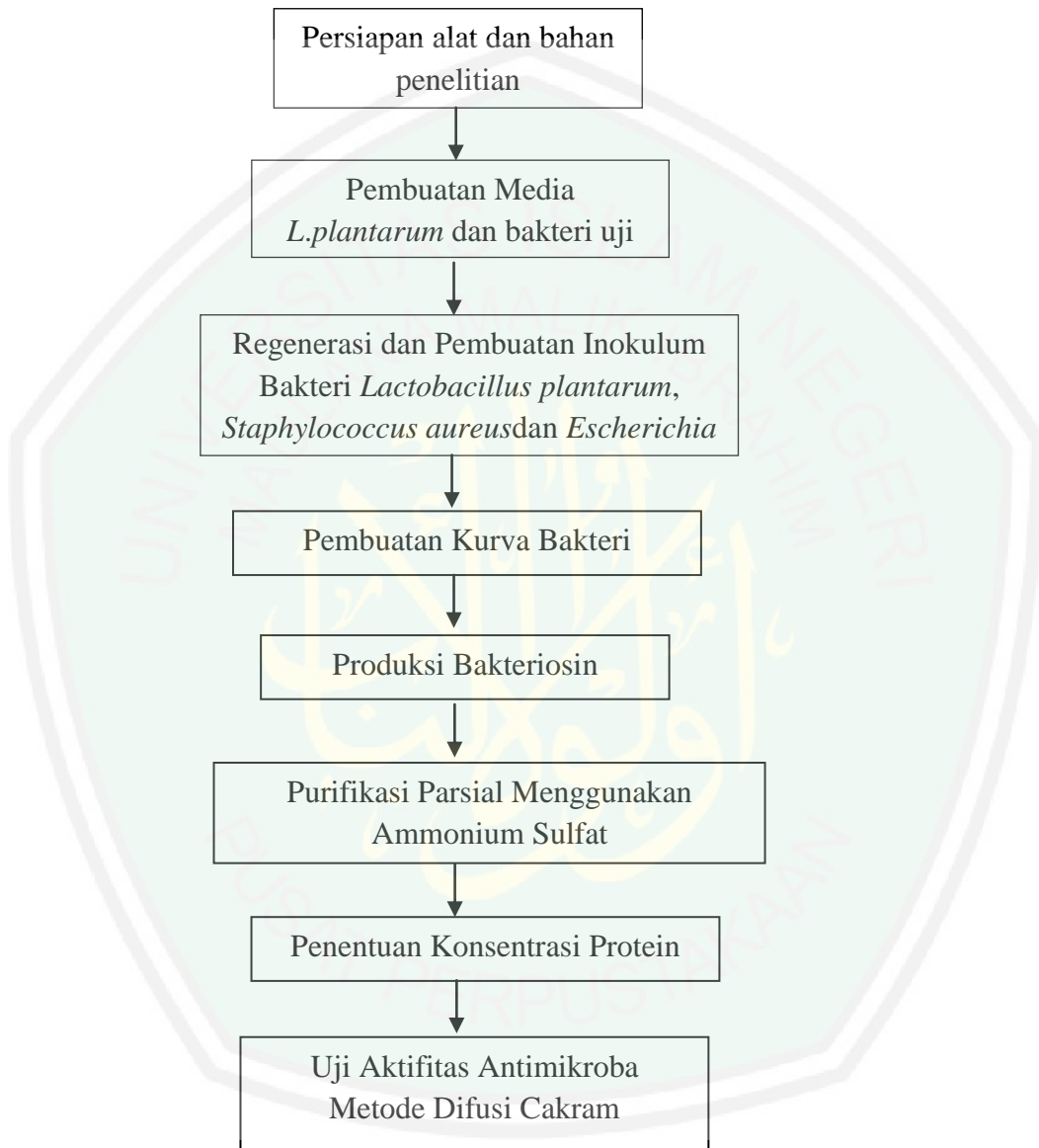
- Najmuddin, A. 2006. Aktivitas Antimikroba Yogurt Probiotik Dari Susu Kambing Saanen Dan Pesa (Persilangan Peranakan Etawah Dan Saanen) Selama Penyimpanan. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor
- Novirisandi, R. 2012. Kajian viabilitas dan pola pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* pada variasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi. *Skripsi*. Departement biologi Fakultas sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Ogunbawo, S. T., A. I. Sarni & A. A. Onilude. 2003. Characterization Of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus Plantarum* F1 And *Lactobacillus Brevis* Og1. *Afric. Journal Biotechnol.* Vol:2. No. 8.: 210-227.
- Oktaviani, Eka Pratiwi (2014). Kualitas dan Aktivitas Antioksidan Minuman Probiotik dengan Variasi Konsentrasi Ekstrak Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*). S1 thesis, UAJY.
- Laili, Oktaviani. 2008. *Potensi Bakteri Asam Laktat Yang Di Isolasi Sebagai Perlindungan Terhadap Kanker Usus*. [http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal\\_natur/vol5\(2\)/usman.pdf/bioindustri.blogspot.com/2008/05/bakteri-asam-laktat-yang-diisolasi-dari-21.html](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol5(2)/usman.pdf/bioindustri.blogspot.com/2008/05/bakteri-asam-laktat-yang-diisolasi-dari-21.html) diakses pada tanggal 21 Februari 2018.
- Pan, X., Chen F., Wu T., Tang H., Dan Zhao Z. 2009. The Acid , Bile Tolerance And Antimicrobial Property Of *Lactobacillus Acidophilus* Nit. *J. Food Control.* 20 : 598-602.
- Paulus, R. 2009. Karakteristik Mutu Bakso Sapi Dengan Penggunaan Supernatan Yang Mengandung Antimikroba Dari *Lactobacillus Plantarum* 1a5 Pada Penyimpanan Suhu Dingin. Departemen Ilmu Produksi Dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Itb, Bogor.
- Paraday, J.L., C.R. Caron, A.B.P. Medeiros and C. R. Soccol. 2007. Bacteriocin From Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties And Use As Biopreservatives. *Bracilli. Arch. J. Biol. Technol.* 50 (3):521-542.
- Poedjadi, A. 2004. Dasar-Dasar biokimia. Universitas Indonesia press, Jakarta.
- Pelczar, M.J. Dan E.C.S. Chan. 2007. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Terjemahan R.S. Hadioetomo, T. Imas, S. D. Tjitrosomodan S. L. Angka. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pierce. 2005. *Protein Stability And Storage*. [Www.Piercenet.Com](http://www.piercenet.com)

- Permanasari,R.2008. Karakteristik Substrat Antimikroba Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi Dari Daging Sapi Dan Aktivitas Antagonistiknya Terhadap Bakteri Patogen. Skripsi. Fakultas Peternakan. Bogor:IPB.
- Pratiwi, S. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Penerbit Erlangga.
- Rachmania,R.A, dkk. 2017. Profil Berat Molekul Enzim Protease Buah Nanas (*Ananas Comosus* L.Merr) Dan Pepaya (*Carica Papaya* L.)Menggunakan Metode Sds-Page.*ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, Vol. 13 No. 1.
- Rajaram, P., Dkk. 2010. Purification And Characterization Of A Bacteriocin Produced By *Lactobacillus Lactis* Isolated From Marine Environment. *Journal Food Science And Tecnology*.Vol 2 (2).
- Rashid,Md.Hu.,K.Togo,M.Ueda And T.Miyamoto.2009. Characterization Of Bacteriocin Produced By *Streptococcus Bovis* J240-2 Isolated From Traditional Fermented Milk 'Dahi'. *Anim. Sci.J.* 80:70-78
- Ray, B.&A.Bhunia.2007.Fundamental food microbiology.4<sup>th</sup>edition.Crc Press, Bocaraton,London, New York, Washington, D.C.
- Razak, A. Rahman. 2009. Produksi Senyawa Bakteriosin Secara Fermentasi Menggunakan Isolat BAL *Enterococcus Faecium* Du55 Dari Dangke.*Indonesia Chemica Acta*. Vol 2 No 2
- Sifour, M., Dkk. 2012. Production And Caracterization Of Bacteriocin Of *Lactobacillus plantarum* F12 With Inhibitory Activity Against *Listeria Monocytogenes*. Vol 2.
- Savadogo,A.,A.T. Q.Cheik, H.N.B. Imael And S. A.Traore. 2006. Bacteriocins and Lactic acid bacteria– Amini review. *Afric.J. Biotechnol.* 5 (9):678-683
- Salminen, S., Wright, AV., Ouwehand A. 2004.*Lactic Acid Bacteria*. New York : Marckel Dekker.
- Setianingsih, S. 2010. Kajian Senyawa Antimikroba Bakteri Asam Laktat Homofermentatif Isolat Asi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor:Bogor
- Saenz, Y, Rojo-Bezares Dkk. 2009. Genetic Diversity Of Pln Locus Among Oenological *Lactobacillusplantarum* Strains. *Int J Food Microbial.* 134: 176-183.
- Scopes Rk. 1987.*Protein Purification*. New York. Spinger-Verlag

- Shihab, M. Quraish. 2015. Tafsir Surah Al-Furqon ayat 2. <https://tafsirq.com/25-al-furqan/ayat-2#tafsir-quraish-shihab>. Diakses 13 Maret 2018.
- Suparjo, 2008. Bakteriosin dan Peranannya dalam ekologi mikrobia rumen. Laboratorium makanan ternak fakultas peternakan jambi.
- Suwayvia, Nadya. 2016. Produksi Bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan pH. *Skripsi*. Central library of Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Syahniar, T. Mahiseta. 2009. Produksi dan Karakterisasi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* 1a5 Serta Aktivitas Antimikrobanya Terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Departemen Ilmu Produksi Dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Todar, K. 2011. Fermentation Of Food By Lactic Acid Bacteria. *Todar Online Text Book Of Bacteriology*. Diakses Pada 14 Oktober 2016.
- Todorov, S. D. & L. M. T. Dicks. 2005. Effect Of Growth Medium On Bacteriocin Production By *Lactobacillus Plantarum* St 194bz, A Strain Isolated From Boza. *J. Food. Technol Biotechnol*. 43 (2): 165-173.
- Tortora, G., Fince, B. R. dan Case, C. L. 2001. *Introduction Microbiology Edisi 7*. San Francisco spanyol : Addison Wesley angman.
- Tortora G.J., B.R. Funke & C.L. Case. 2006. *Microbiology An Introduction*. 9<sup>th</sup> edition. Pearson Education, Inc. Publishing As Benjamin Cummings, San Fransisco.
- Usmiati, S Dan Tri Mawarti. 2007. Seleksi Dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin Dari *Lactobacillus Sp*. Hal 27-37. Vol 4 (1).
- Waluyo, L. 2008. *Teknik Dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. Malang: Umm Press.
- Yuningsih, S. 2006. Isolasi Dan Pencirian Protease Dari Bakteri Isolat Nato. *Skripsi*. Bogor: Fmipa Ipb

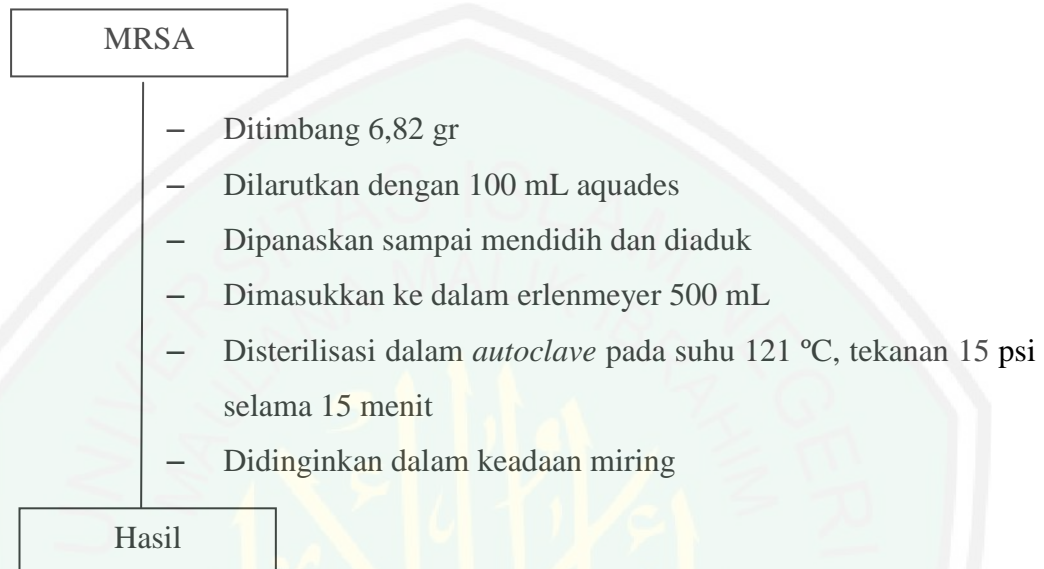
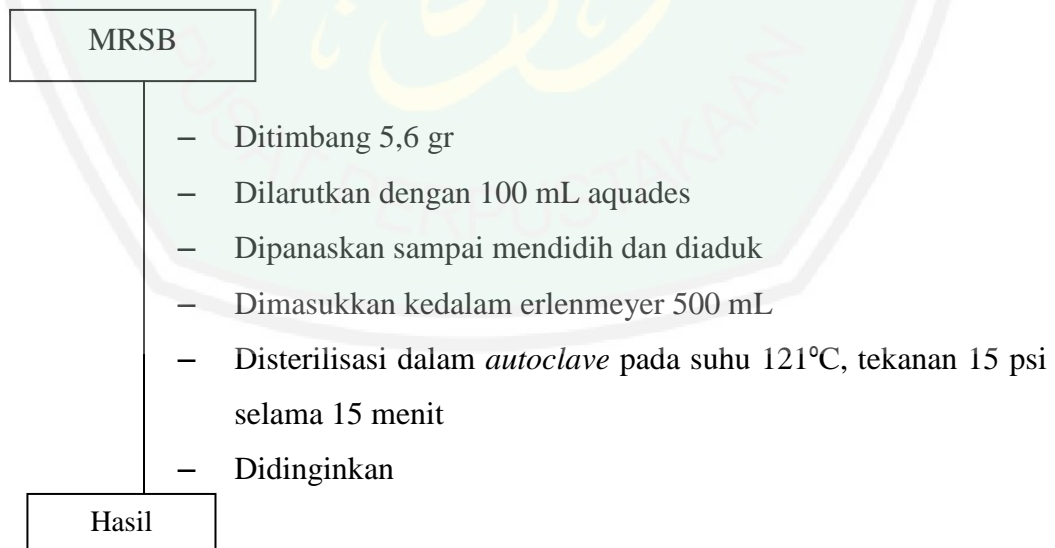
Lampiran 1.

RANCANGAN PENELITIAN

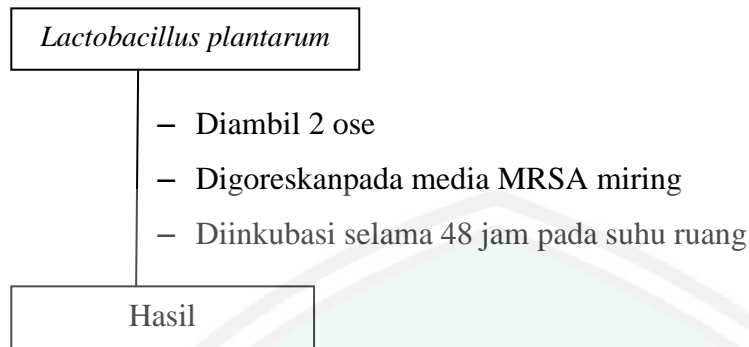


## Lampiran 2.

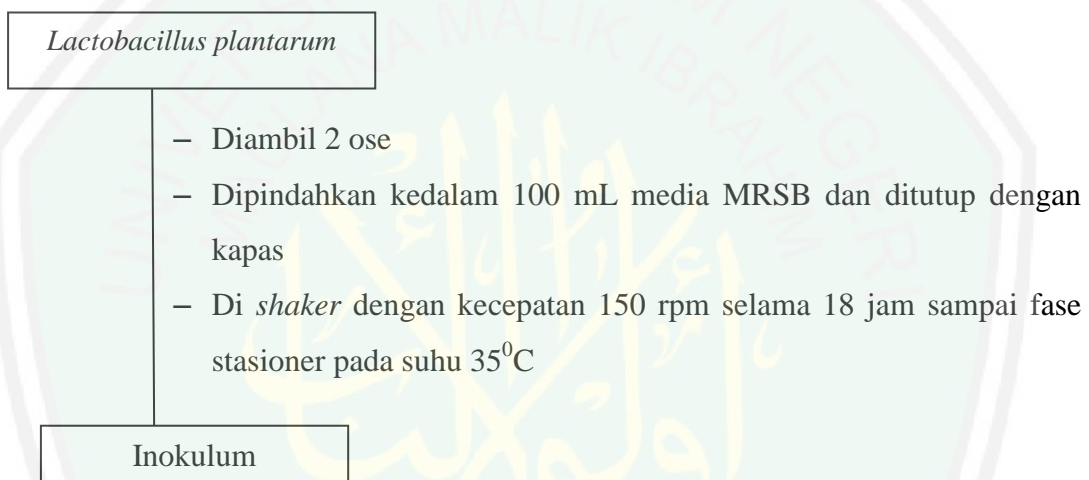
## DIAGRAM ALIR

1.1 Pembuatan Media MRSA (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*)1.2 Media MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*)

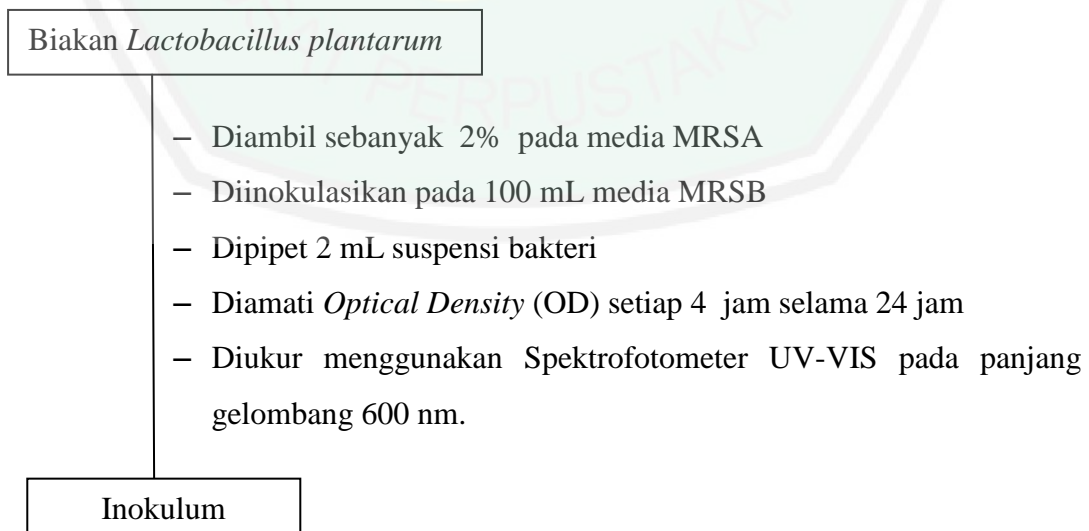
### 1.3 Regenerasi *Lactobacillus plantarum*



#### 1.3.1 Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum*



#### 1.1 Pembuatan Kurva bakteri



## 1.2 Perhitungan Jumlah Sel Bakteri

NaCl 0,9% steril

- Dimasukkan kedalam 10 tabung reaksi dengan volume masing-masing 9 ml
- Ditambahkan inokulum bakteri sebanyak 1 ml pada tabung pertama dan divortex
- Dipipet larutan dalam tabung 1 sebanyak 1 ml
- Dimasukkan dalam tabung 2
- Dilakukan perlakuan yang sama sampai tabung ke 10
- Dihitung jumlah total bakteri dengan metode *total plate count* (TPC)

Hasil

## 1.3 Produksi Bakteriosin Media MRSB

Isolat *Lactobacillus plantarum*

- Diinokulasi ke dalam 100 mL media MRSB dengan konsentrasi inokulum 1%, 5% dan 10%
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama fase tengah logaritmik, fase akhir logaritmik dan fase tengah stationer.
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit
- Dikondisikan pada pH 7 menggunakan NaOH 1M
- Dimurnikan menggunakan ammonium sulfat dan dialisis

Hasil

#### 1.4 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat

Supernatan Antimikroba Netral

- Ditambah dengan padatan amonium sulfat 60% sebanyak 258 gram
- Diaduk selama 24 jam pada suhu 4°C
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit (4°C)
- Dilartkan 25 ml buffer kalium fosfat 0,2 M (pH 7.0)
- Didialisis menggunakan kantong selulosa
- Didiamkan dalam buffer kalium fosfat 0,2 M sebanyak 500 ml suhu 4°C
- Ditetesi larutan BaCl<sub>2</sub> 0,1 M
- Dihentikan setelah tidak ada endapan putih
- Diukur konsentrasi protein dengan metode biuret

Hasil

#### 1.5 Penentuan Konsentrasi Protein

##### 1.9.1 Pembuatan Kurva Standar

Larutan standart BSA

- Dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1mg/ml
- Dipipet masing-masing 1 ml dan ditambah 4 ml reagen biuret
- Dihomogenkan dengan vortex
- Didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit
- Diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  550 nm

Hasil

### 1.9.2 Analisis Konsentrasi Protein Bakteriosin

#### Protein Bakteriosin

- Diambil sebanyak 1 ml
- Ditambahkan aquades hingga volume menjadi 10 ml
- Dihomogenkan menggunakan vortex
- Diambil 1 ml dan ditambah 4 ml reagen biuret
- Dihomogenkan dengan vortex
- Didiamkan selama 30 menit
- Diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  550 nm

Hasil

### 1.6 Uji Aktivitas Antimikroba

#### 1.6.1 Media NA(Nutrien Agar)

#### NA

- Ditimbang 5,6 gr
- Diambil sebanyak 2 gram
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara aseptis
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan dengan posisi miring

Hasil

### 1.6.2 Media NB(Nutrient Broth)

**NB**

- Ditimbang 5,6 gr
- Diambil sebanyak 1,8 gram
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades hangat
- Dipanaskan sampai mendidih
- Dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL
- Ditutup dengan kapas steril
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan hingga suhu sekitar 40- 45°C

Hasil

### 1.10.3 Regenerasi Bakteri uji

*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

- Diambil 1 ose
- Digoreskan pada media NA miring
- Ditutup dengankapas
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

Hasil

### 1.10.4 Pembuatan Inokulum *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

- Diambil 2 ose
- Dipindahkan kedalam 100 mL media MRSB dan ditutup dengan kapas
- Dishaker dengan kecepatan 150rpm selama 18 jam sampai fase stasioner pada suhu 35°C

Inokulum

### 1.10.5 Uji Aktivitas Antimikroba Metode Difusi cakram

*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

- Diambil sebanyak 50  $\mu$ l
- Dibuat kertas cakram steril dengan diameter 6 mm
- Direndam didalam larutan ekstrak selama 30 menit
- Diambil dan diletakkan kertas cakram mengandung ekstrak kasar metabolit sekunder diatas medium uji aktivitas antibakteri
- Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C

Inokulum

**Lampiran 3.****Perhitungan Pembuatan Bahan****1. Pembuatan Larutan NaOH 1 N**

$$M = \frac{n \text{ (mol)}}{v \text{ (volume)}}$$

$$\text{mol} = \frac{m}{M_r}$$

$$M = \frac{m/M_r}{v}$$

$$1 \text{ M} = \frac{m/40}{0,1\text{L}}$$

$$m = 4 \text{ gram}$$

**2. Pembuatan NaCl 0,9%**

$$\%b/v = \frac{\text{berat zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

$$0,9\% = \frac{\text{berat zat terlarut}}{100 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$0,9 \times 100 = 100 \times \text{berat zat terlarut}$$

$$0,9 \text{ gram} = \text{berat zat terlarut}$$

**3. Pembuatan Konsentrasi inokulum**

a. 1%

$$\%v/v = \frac{\text{volume zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

$$1\% = \frac{\text{volume zat terlarut}}{200 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$1 \times 200 \text{ ml} = 100 \times \text{volume zat terlarut}$$

$$200\text{ml} = 100 \times \text{volume zat terlarut}$$

$$\frac{200 \text{ (ml)}}{100 \text{ (ml)}} = 2 \text{ ml volume zat terlarut}$$

b. 5%

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{volume zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

$$5\% = \frac{\text{volume zat terlarut}}{200 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$5 \times 200 \text{ ml} = 100 \times \text{volume zat terlarut}$$

$$1000 \text{ ml} = 100 \times \text{zat terlarut}$$

$$\frac{1000 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = \text{volume zat terlarut}$$

$$10 \text{ ml} = \text{Volume zat terlarut}$$

c. 10%

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{volume zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

$$10\% = \frac{\text{volume zat terlarut}}{200 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$10 \times 200 = 100 \times \text{zat terlarut}$$

$$2000 = 100 \times \text{volume zat terlarut}$$

$$20 \text{ ml} = \text{volume zat terlarut}$$

#### 4. Pembuatan Amonium Sulfat 60%

Untuk kejenuhan 60% dalam 10 ml media, maka ditambahkan

$$\text{amonium sulfat sebanyak} = 361 \frac{\times 10}{1000}$$

$$= 3,61 \text{ gram}$$

$$= 3,61 \text{ gram}$$

## 5. Pembuatan Buffer Fosfat

a.) Pembuatan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  stok 1M

$$M = \frac{n \text{ (mol)}}{v \text{ (volume)}}$$

$$\text{mol} = \frac{m}{Mr}$$

$$1 \text{ M} = \frac{n}{0,025 \text{ L}}$$

$$n = 1\text{M} \times 0,025 \text{ L}$$

$$n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{Mr}$$

$$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{120 \text{ gr/mol}}$$

$$\text{Massa} = 0,025 \text{ mol} \times 120 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Massa} = 3 \text{ gr}$$

Untuk membuat larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M diperlukan 3 gr dan dilarutkan dengan aquades kemudian ditanda bataskan dalam labu ukur 25 ml.

b.) Pembuatan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  stok 1M

$$M = \frac{n \text{ (mol)}}{v \text{ (volume)}}$$

$$\text{mol} = \frac{m}{Mr}$$

$$M = \frac{m}{M \times V}$$

$$1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{0,025 \text{ L}}$$

$$n = 1\text{M} \times 0,025 \text{ L}$$

$$n = 0,025 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{Mr}$$

$$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{142 \text{ gr/mol}}$$

$$\text{Massa} = 0,025 \text{ mol} \times 142 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Massa} = 3,55 \text{ gr}$$

untuk membuat larutan buffer 1M pH 7 diperlukan 3,55 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan dilarutkan dengan aquades kemudian ditanda bataskan menggunakan labu ukur 25 ml.

c.) Pengenceran 1M menjadi 0,5 M

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1\text{M} = 20 \text{ ml} \times 0,5\text{M}$$

$$V_1 = 200/0,5$$

$$= 10 \text{ ml}$$

Dilartukan 10 ml larutan stok dengan aquades sampai volume 20 ml dan diatur pH nya.

### 6. Pembuatan Reagen Biuret

Tembaga (II) sulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) sebanyak 1,5 g dan 0,6 g kalium natrium ttrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) dilarutkan dengan aquades dalam labu takar 100 mL. Larutan ditambah 30 mL natrium hidroksida 10% sambil dikocok-kocok dan selanjutnya ditambah aquades sampai tanda batas.

### 7. Pembuatan NaOH 10%

$$\%b/v = \frac{\text{berat zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

$$10\% = \frac{\text{berat zat terlarut}}{100 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$10 \times 100 = 100 \times \text{berat zat terlarut}$$

$$10 \text{ ram} = \text{berat zat terlarut}$$

### 8. Preparasi kantung selofan

- Kantung selofan dididihkan dalam 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2,5 gram dalam 50 ml) selama 15 menit.
- Didihkan dengan 50 Mm EDTA (0,73 gram dalam 50 ml).
- Dicuci dengan aquades steril mendidih selama 15 menit.
- Rendam kantung selofan dalam air, jangan sampai kering.

### 9. Pembuatan Kurva Standar Protein

Cara membuat larutan stok Bovin Serum Albumin (BSA) 1 ppm adalah  
 $1 \text{ ppm} = 50 \text{ mg}/50 \text{ mL}$

Untuk membuat larutan protein standar 1 ppm dibutuhkan 50 mg Bovin Serum Albumin (BSA) yang dilarutkan dalam 50 mL aquades. Selanjutnya dibuat larutan BSA dengan variasi konsentrasi 0,1;0,2; 0,4; 0,6; 0,08; 1 ppm dalam 10 ml aquades sesuai dengan hasil perhitungan berikut:

a) Konsentrasi 0,2 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 = 10 \times 0,2$$

$$V_1 = 2 \text{ ml dalam } 8 \text{ mL aquades}$$

b) Konsentrasi 0,4 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 = 10 \times 0,4$$

$$V_1 = 4 \text{ ml dalam } 6 \text{ mL aquades}$$

c) Konsentrasi 0,6 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 = 10 \times 0,6$$

$$V_1 = 6 \text{ ml dalam } 4 \text{ mL aquades}$$

d) Konsentrasi 0,8 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 = 10 \times 0,8$$

$$V_1 = 8 \text{ ml dalam } 2 \text{ mL aquades}$$

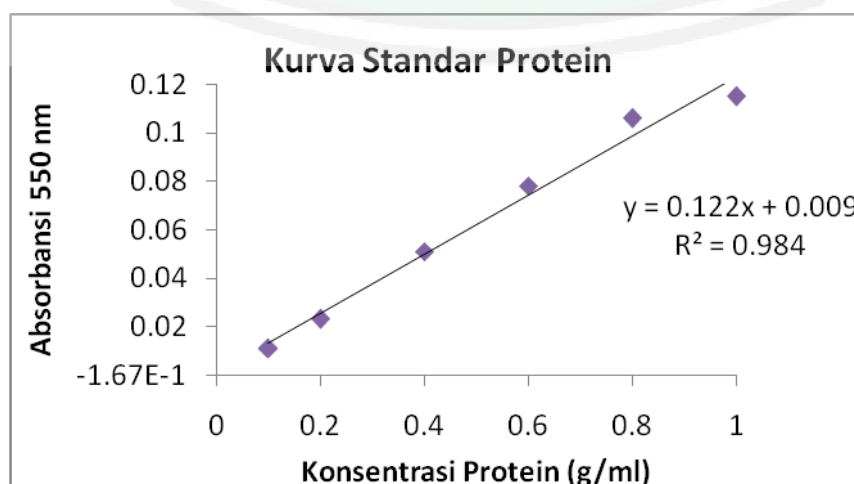
e) Konsentrasi 1 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1 = 10 \times 1$$

$$V_1 = 10 \text{ ml dalam } 9 \text{ mL aquades}$$

### 9.1 Kurva Standar Protein



## 9.2 Hasil Pengukuran Absorbansi BSA

Konsentrasi protein (mg/ml)	Absorbansi
0.1	0.011
0.2	0.023
0.4	0.051
0.6	0.078
0.8	0.106
1	0.115

## 9.3 Menentukan Konsentrasi Protein Bakteriosin

Konsentrasi protein bakteriosin atau X ditentukan dengan menggunakan persamaan linear dari kurva standar larutan BSA sebagaimana berikut:

Setelah Purifikasi

Misal:

$$y = ax + b$$

$$y = 0,122x + 0,000 \times fp$$

$$0,0055 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,0055 / 0,122 \times 10$$

$$= 0,045 \text{ mg/ml}$$

$$y = 0,122x + 0,000 \times fp$$

$$0,0027 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,0027 / 0,122 \times 10$$

$$= 0,022 \text{ mg/ml}$$

$$x = (0,045 + 0,022) : 2$$

$$= 0,033 \text{ mg/ml}$$

Sebelum Purifikasi

Misal:  $y = ax + b$

$$y = 0,122x + 0,000 \times fp$$

$$0,4204 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,4204 / 0,122 \times 10$$

$$= 3,445 \text{ mg/ml}$$

$$y = 0,122x + 0,000 \times fp$$

$$0,4074 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,4074 / 0,122 \times 10$$

$$= 3,339 \text{ mg/ml}$$

$$x = (3,445 + 3,339) : 2$$

$$= 3,392 \text{ mg/ml}$$

## Lampiran 4

### 4.1 Nilai Optical Density (OD) Kurva Pertumbuhan

Jam	Absorbansi
0	0,5154
2	1,2141
6	2,0925
8	2,3300
10	2,4802
12	2,5366
14	2,6078
16	2,6455
18	2,7519
20	2,7305
22	2,9280
24	2,8831
26	3,0635
28	2,9214
30	3,0182
32	2,9071
34	2,8374
36	2,7226
40	2,6876

### 4.2 Hasil perhitungan jumlah bakteri (TPC)

Sampel	Absorbansi	
		Hasil absorbansi yang dipilih adalah 0,6054
A	0,1979	Jumlah bakteri = bakteri hitung x 1/fp
B	0,4273	= $63,5 \times 10^{-7}$
C	0,6054	= $63,5 \times 10^{-7} \text{ cfu}$
D	0,8170	
E	0,9982	

Factor Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung				
	A	B	C	D	E
$10^{-5}$	TBUD	TBUD	TBUD	SPRIDER	SPRIDER
$10^{-6}$	134,5	238	550,5	TBUD	TBUD
$10^{-7}$	16	26,5	63,5	95	728
$10^{-8}$	1	3	6	12,5	40,5
$10^{-9}$	0	1	4	1	5
$10^{-10}$	0	0	0	0	0

Tabel Hasil Uji Antibakteri terhadap Bakteri Indikator

4.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

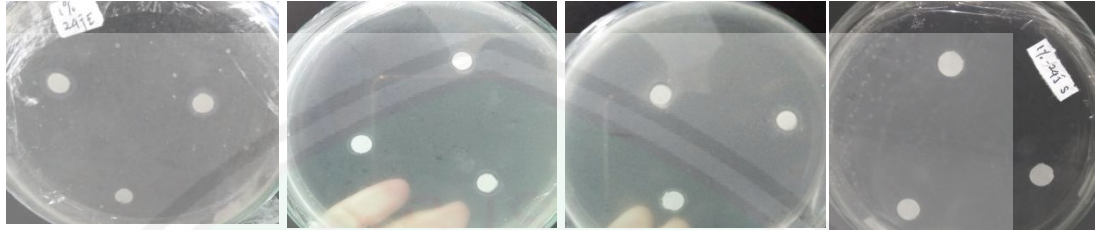
Konsentrasi inokulum	Lama fermentasi(jam)	Luas zona hambat (mm)	
		Ulangan 1	Ulangan 2
1%	24	3,23	2,9
	28	2,0	1,3
	32	2,68	2,2
5%	24	1,2	2,7
	28	3,26	1,95
	32	2,55	2,3
10%	24	2,65	3,33
	28	2,3	3,9
	32	4,25	5,9

4.4 Bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi inokulum	Lama fermentasi (jam)	Luas zona hambat (mm)	
		Ulangan 1	Ulangan 2
1%	24	2,95	3,5
	28	1,55	2,0
	32	2,2	2,13
5%	24	4,01	4,48
	28	2,53	1,5
	32	2,0	3,1
10%	24	1,6	1,4
	28	2,4	2,6
	32	3,85	3,11

#### 4.5 Hasil produksi bakteriosin Luas zona hambat terhadap kedua bakteri uji

##### 1% selama 24 jam



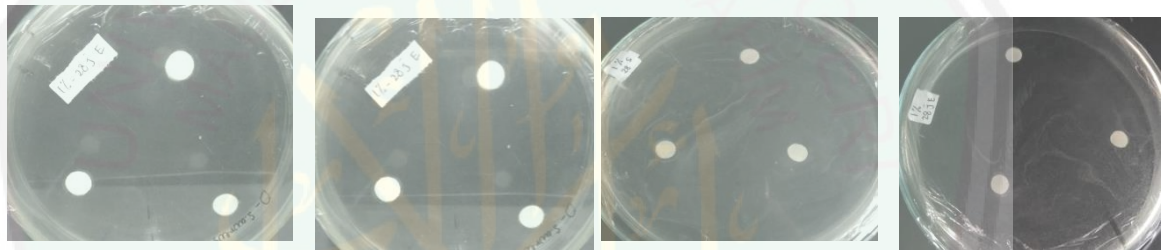
*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

##### 1% selama 28 jam



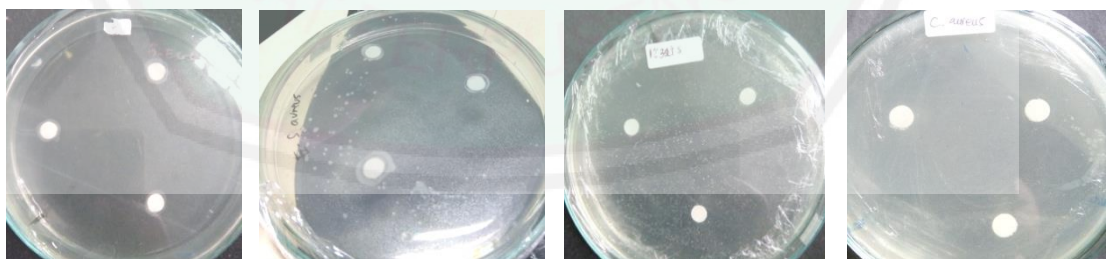
*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

##### 1% selama 32 jam



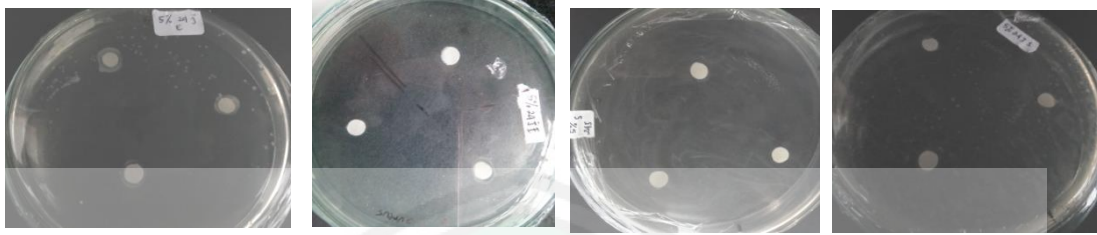
*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

**5% selama 24 jam**



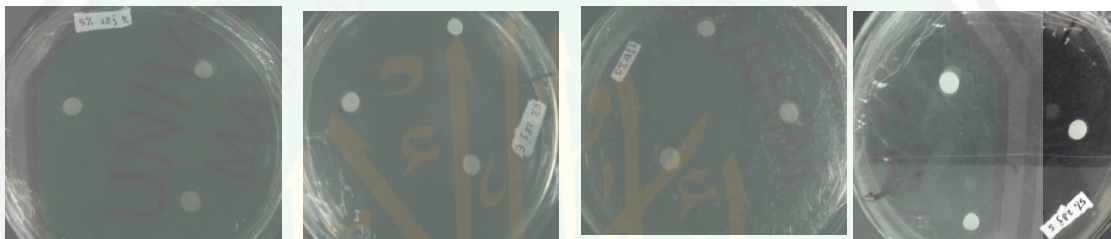
*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

**5 % selama 28 jam**



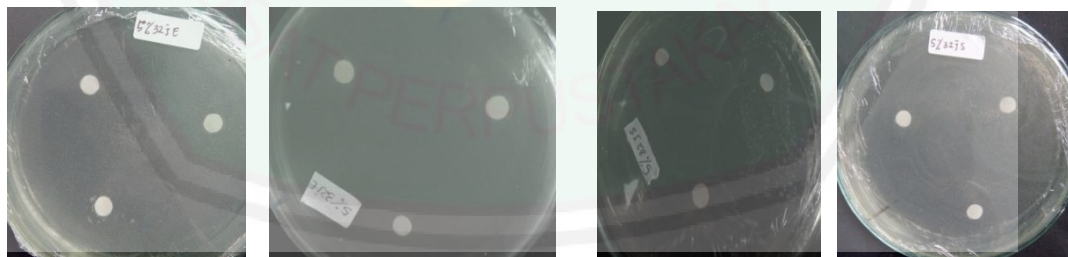
*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

**5% selama 32 jam**

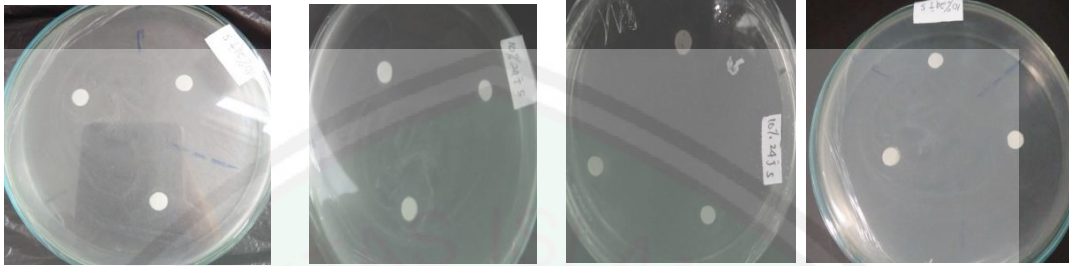
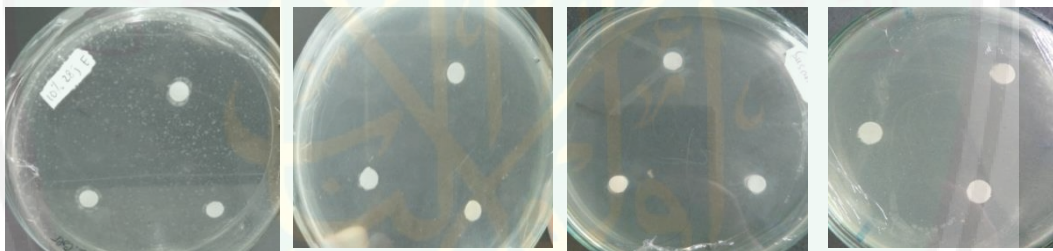
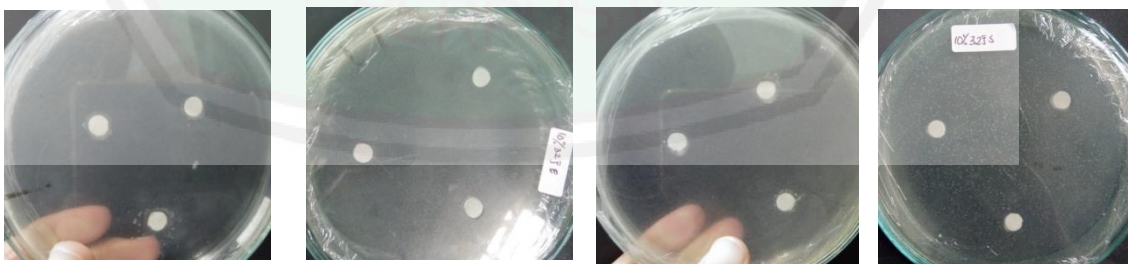


*E. coli*(1)

*E. coli*(2)

*S. aureus* (1)

*S. aureus* (2)

**10% selama 24 jam***E. coli*(1)*E. coli*(2)*S. aureus* (1)*S. aureus* (2)**10 % selama 28 jam***E. coli*(1)*E. coli*(2)*S. aureus* (1)*S. aureus* (2)**10% selama 32 jam***E. coli*(1)*E. coli*(2)*S. aureus* (1)*S. aureus* (2)

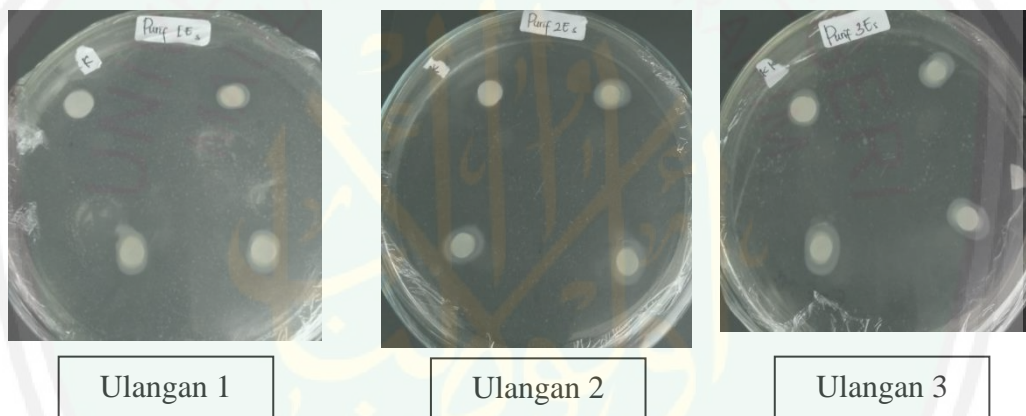
## Lampiran 5

**Tabel 5.1** Aktivitas ekstrak bakteriosin sebelum dan setelah purifikasi

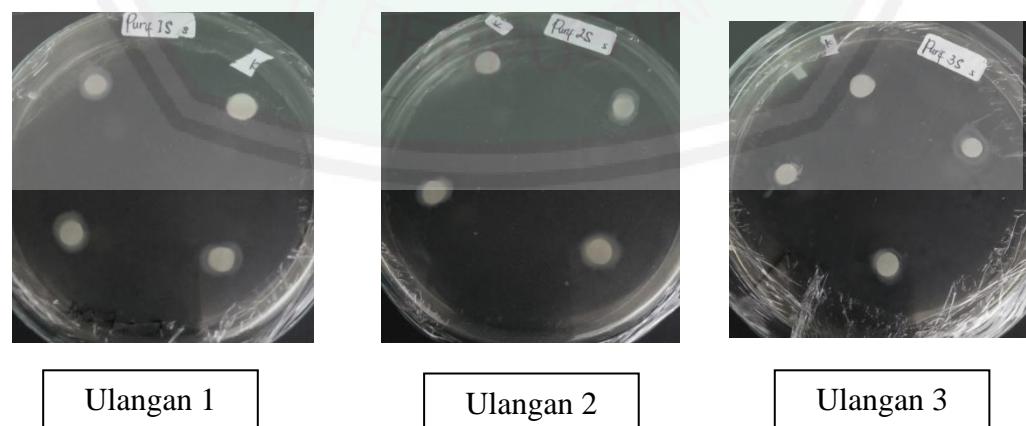
Bakteri Indikator	Sebelum Purifikasi		Setelah Purifikasi	
	Protein (mg/ml)	Zona Hambat (mm)	Protein (mg/ml)	Zona Hambat (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	35,03	2,77	0,262	5.61
<i>Escherichia coli</i>		2.60		6.05

## 5.2 Hasil Aktivitas ekstrak bakteriosin sebelum dan setelah purifikasi

### 5.2.1 *Escherichia coli*



### 5.2.2 *Staphylococcus aureus*



## Univariate Analysis of Variance *Staphylococcus aureus*

[DataSet0]

### Between-Subjects Factors

		N
konsentrasi	1	6
	10	6
	5	6
inkubasi	24	6
	28	6
	32	6

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:aktivitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12.611 <sup>a</sup>	8	1.576	7.818	.003
Intercept	122.253	1	122.253	606.329	.000
konsentrasi	1.016	2	.508	2.521	.135
inkubasi	2.536	2	1.268	6.289	.020
konsentrasi * inkubasi	9.058	4	2.265	11.231	.002
Error	1.815	9	.202		
Total	136.678	18			
Corrected Total	14.425	17			

a. R Squared = .874 (Adjusted R Squared = .762)

## Post Hoc Tests

### konsentrasi

#### Multiple Comparisons

aktivitas

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	10	-.1050	.25925	.914	-.8288	.6188
	5	-.5483	.25925	.142	-1.2722	.1755
10	1	.1050	.25925	.914	-.6188	.8288
	5	-.4433	.25925	.254	-1.1672	.2805
5	1	.5483	.25925	.142	-.1755	1.2722
	10	.4433	.25925	.254	-.2805	1.1672

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .202.

### Homogeneous Subsets

aktivitas

Tukey HSD

konsentrasi	N	Subset
		1
1	6	2.3883
10	6	2.4933
5	6	2.9367
Sig.		.142

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .202.

## inkubasi

### Multiple Comparisons

aktivitas

Tukey HSD

(I) ink (J) ub inkuba asi si	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
24 28	.8933*	.25925	.018	.1695	1.6172
32	.2583	.25925	.597	-.4655-	.9822
28 24	-.8933*	.25925	.018	-1.6172-	-.1695-
32	-.6350-	.25925	.085	-1.3588-	.0888
32 24	-.2583-	.25925	.597	-.9822-	.4655
28	.6350	.25925	.085	-.0888-	1.3588

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .202.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Homogeneous Subsets

aktivitas

Tukey HSD

inkubasi	N	Subset	
		1	2
28	6	2.0967	
32	6	2.7317	2.7317
24	6		2.9900
Sig.		.085	.597

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .202.

## Univariate Analysis of Variance *Eschericia coli*

[DataSet0]

Between-Subjects Factors		
		N
konsentrasi	1	6
	10	6
	5	6
inkubasi	24	6
	28	6
	32	6

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: aktivitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.448 <sup>a</sup>	8	1.931	3.278	.048
Intercept	142.242	1	142.242	241.480	.000
konsentrasi	7.472	2	3.736	6.343	.019
inkubasi	2.411	2	1.205	2.046	.185
konsentrasi * inkubasi	5.565	4	1.391	2.362	.131
Error	5.301	9	.589		
Total	162.992	18			
Corrected Total	20.750	17			

a. R Squared = .745 (Adjusted R Squared = .517)

## Post Hoc Tests

### konsentrasi

#### Multiple Comparisons

aktivitas

Tukey HSD

(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	10	-1.3367*	.44311	.035	-2.5738-	-.0995-
	5	.0583	.44311	.991	-1.1788-	1.2955
10	1	1.3367*	.44311	.035	.0995	2.5738
	5	1.3950*	.44311	.029	.1578	2.6322
5	1	-.0583-	.44311	.991	-1.2955-	1.1788
	10	-1.3950*	.44311	.029	-2.6322-	-.1578-

Based on observed means.

The error term is Mean

Square(Error) = .589.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Homogeneous Subsets

aktivitas

Tukey HSD

konsentrasi	N	Subset	
		1	2
5	6	2.3267	
1	6	2.3850	
10	6		3.7217
Sig.		.991	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

### Multiple Comparisons

aktivitas

Tukey HSD

(I) inkubasi	(J) inkubasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24	28	.2167	.44311	.878	-1.0205	1.4538
	32	-.6450	.44311	.355	-1.8822	.5922
28	24	-.2167	.44311	.878	-1.4538	1.0205
	32	-.8617	.44311	.182	-2.0988	.3755
32	24	.6450	.44311	.355	-.5922	1.8822
	28	.8617	.44311	.182	-.3755	2.0988

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .589.

The error term is Mean Square(Error) = .589.

inkubasi

### Homogeneous Subsets

aktivitas

Tukey HSD

inkubasi	N	Subset
		1
28	6	2.4517
24	6	2.6683
32	6	3.3133
Sig.		.182

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .589.



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN KIMIA

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933  
www.uin-malang.ac.id Email: info\_uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : Susanti Anugrah Rizki  
NIM : 12630004  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriosin Oleh *Lactobacillus plantarum* Dengan Perubahan Konsentrasi Molekulum Dan Lama Fermentasi  
Pembimbing Utama : ANIK MAULIATIN, S.T MP  
Pembimbing Agama :  
Konsultan : Akyumul Jannah S.Si. MP

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan (ditulis tangan)	Tanda tangan (Pembimbing)
1		<del>Buku</del> Jurnal Penelitian		
2		BAB I revisi		
3.		BAB I dan III		
4		BAB III revisi		
5		BAB III		
6		BAB III		
7.		BAB II		
8		BAB I, II, III		
9.		BAB I dan III		
		BAB I dan III		
		BAB I, II, III		
			Acc. prop	
		BAB IV revisi		
		BAB IV revisi		
	22/3/18	BAB IV + lampiran	Acc. kompre	
		Nasfah	Acc lampir	

