

**PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI YEAST EKSTRAK
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG
DIHASILKAN OLEH *Lactobacillus plantarum***

SKRIPSI

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

Oleh:

**RIA ROSIDAH
13630038**

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

**PENGARUH PH MEDIA DAN YEAST EKSTRAK TERHADAP
AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus plantarum***

SKRIPSI

Oleh:
RIA ROSIDAH
NIM. 13630038

**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 Abtokhi, M.Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**




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

**PENGARUH PH MEDIA DAN YEAST EKSTRAK TERHADAP
AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus plantarum***

SKRIPSI

Oleh:
RIA ROSIDAH
NIM. 13630038

**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**

Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M.Si
NIP. 19770720 200312 2 001

(.....)

Ketua Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

(.....)

Sekretaris Penguji : Anik Maunatin, S.T, M.P
NIP. 20140201 2 412

(.....)

Anggota Penguji : Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

(.....)



**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ria Rosidah

NIM : 13630038

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Kimia

Judul : Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak

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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini merupakan hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Mei 2018

Yang membuat pernyataan



Ria Rosidah
NIM. 13630038

MOTTO

... فَإِذَا عَزَمْتَ فَتَوَكَّلْ عَلَى اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ يُحِبُّ الْمُتَوَكِّلِينَ ﴿١٥٩﴾

“Apabila kamu telah bertekad, Maka bertawakkallah kepada Allah.
Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang bertawakkal kepada-Nya.
(Q.S. Ali Imran-159)”



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbilalamiin, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar. Shalawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad SWA beserta para keluarga, sahabat serta pengikutnya.

Penulis mempersembahkan karya ini kepada Bapak Supriyono dan Ibu Siti Muawanah sebagai orangtua yang tiada henti memberikan perhatian, kasih sayang, doa dan nasehat untuk keberhasilan penulis serta pengorbanannya dalam memberikan materi sehingga tercukupi setiap kebutuhan penulis

Tak lupa penulis ucapkan terimakasih, jazakumullah khoiron katsiron kepada sahabat sekaligus saudara:

1. Mira, Nisa', Baroroh, Shobib dan Vava yang sejak SMP hingga kini selalu ada dan senantiasa memberikan dukungan untuk menjadikan penulis sebagai pribadi yang lebih baik
2. Alfi, luluk, MbK Nuri, MbK Viky, MbK iir, Lia, Lala, Nita dan Syifa yang menemani penulis dari tidur hingga bangun, memberikan semangat dan motifasi, keceriaan juga canda tawa
3. Susan yang mau jatuh bangun, bekerjasama untuk meraih kesuksesan dalam penelitian
4. MbK Hikma, Iza, Zulfa, Rina, Neni dan masih banyak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yakni yang setia mendengar dan membantu keluh kesah penulis
5. Keluarga besar biokimia dan Mikrobiologiserta semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini

Malang, 28 Mei 2018

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat taufik hidayah serta inayahNya. Sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*” ini. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah membawa kita dari jalan kegelapan menuju jalan yang terang benderang yakni Agama Islam.

Penulis menghaturkan ucapan terimakasih seiring doa dan harapan Jazakumullahu Ahsanal Jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia
4. Ibu Anik Maunatin M.P., Ibu Akyunul Jannah M.P., Bapak Ahmad Abtokhi, M.Pd., selaku dosen pembimbing skripsi yang senantiasa sabar memberikan arahan, bimbingan serta pengalaman yang berharga dalam menyelesaikan skripsi
5. Seluruh civitas akademika Jurusan Kimia terutama dosen dan laboran yang telah memberikan ilmunya selama kuliah

Penulis mengharap ridho Allah SWT, semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca dan penulis. Aamiinya Robbal ‘aalamiin.

Malang, 28 Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
مخلص البحث.....	xv
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteriosin	8
2.2 Bakteri Asam Laktat (BAL).....	10
2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
2.4 Biosintesis Bakteriosin.....	13
2.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Proses Produksi	14
2.5.1 Media.....	13
2.5.2 pH produksi.....	13
2.5.3 Suhu	14
2.5.4 Nutrisi.....	14
2.5.5 Enzim Proteolitik	14
2.6 Purifikasi	15
2.7 Penentuan Aktivitas Antibakteri	13
2.8 Mekanisme Aktivitas Bakteriosin	17
2.9 Bakteri Patogen	18
2.9.1 <i>Escherichiacoli</i>	19
2.9.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat.....	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.2.1 Alat.....	21
3.2.2 Bahan	21
3.3 Rancangan Penelitian.....	22

3.4 Tahap-tahap Penelitian	23
3.5 Prosedur Penelitian	23
3.5.1 Sterilisasi Alat	23
3.5.2 Pembuatan Media	23
3.5.2.1 Pembuatan media MRSA.....	23
3.5.2.2 Pembuatan Media MRSB	24
3.5.2.3 Pembuatan Media NA	24
3.5.2.4 Pembuatan Media NB	24
3.5.3 Regenerasi Bakteri	25
3.5.3.1 Regenerasi <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
3.5.3.2 Regenerasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	25
3.5.4 Pembuatan Inokulum	25
3.5.4.1 Pembuatan Inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
3.5.4.2 Pembuatan inokulum <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	25
3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	26
3.5.6 Penghitungan Jumlah Sel Bakteri.....	26
3.5.7 Produksi Bakteriosin Media MRSB.....	27
3.5.8 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat.....	27
3.5.9 Penentuan Konsentrasi Protein.....	28
3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar.....	28
3.5.9.1 Analisis Konsentrasi Protein.....	28
3.5.10 Uji Aktivitas Antimikroba Metode Difusi Agar.....	28
3.5.11 Analisis Data.....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Media.....	34
4.2 Peremajaan <i>Lactobacillus plantarum</i>	34
4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>	36
4.4 Produksi Bakteriosin Menggunakan Variasi pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak	38
4.5 Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin	39
4.6 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis.....	44
4.7 Kadar Protein Bakteriosin dan Aktivitas Antibakteri Bakteriosin	46
4.8 Kajian Keislaman	50
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pengaruh pH dan konsentrasi yeast ekstrak.....	24
Tabel 4.1 Aktivitas antibakteri Bakteriosin dalam Menghambat Pertumbuhan <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	40
Tabel 4.2 Konsentrasi Protein dan Aktivitas Antibakteri Bakteriosin.....	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri	10
Gambar 2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
Gambar 2.3 Mekanisme Sintesis Bakteriosin	13
Gambar 2.4 Proses Pengendapan Protein dengan Amonium Sulfat	15
Gambar 2.5 Mekanisme Bakteriosin merusak Membran Sel Bakteri Patogen...	18
Gambar 2.6 Bakteri <i>Eschericia coli</i>	19
Gambar 2.6 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan <i>L. plantarum</i>	36
Gambar 4.2 Aktivitas Penghambatan Bakteriosin	40
Gambar 4.3 Reaksi Perubahan Warna ungu pada uji biuret	46
Gambar 4.4 Kurva Standar Protein	47
Gambar 4.4 Aktivitas Penghambatan Bakteriosin Setelah Purifikasi.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	53
Lampiran 2 Skema Kerja	54
Lampiran 3 Perhitungan.....	67
Lampiran 4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>L.plantarum</i>	74
Lampiran 5 Perhitungan Jumlah Sel Bakteri	75
Lampiran 6 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriosin	76
Lampiran 7 Aktivitas Bakteriosin Terhadap Bakteri Indikator	78
Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian.....	83



ABSTRAK

Rosidah, Ria. 2018. Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*. Skripsi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Kimia: AnikMunatin S.T., M.P.

Kata Kunci: *Lactobacillus plantarum*, Bakteriosin, Aktivitas antibakteri

Lactobacillus plantarum merupakan salah satu Bakteri Asam Laktat (BAL) penghasil bakteriosinyaitu senyawa protein yang bersifat antibakteri. Bakteriosin digunakan sebagai pengawet alami pada makananyang aman dan tidak toksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH media, konsentrasi yeast ekstrak serta purifikasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor yaitu pH (5,5; 6,0; 6,5) dan konsentrasi yeast ekstrak (0,5%; 1%; 1,5%). Data yang diperoleh berupa aktivitas antibakteri bakteriosin yang ditunjukkan dengan luas zona hambat. Analisis data menggunakan Two Way Anova.

Bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Luas zona hambat bakteriosin tertinggi pada *Staphylococcus aureus* sebesar 4,03 mm dan pada *Eschericia coli* 3,92 mm. Luas zona hambat bakteriosin setelah purifikasi meningkat yaitu pada *Staphylococcus aureus* sebesar 3,18 mm menjadi 5,08 mm dan pada *Eschericia coli* 3,43 mm menjadi 3,81 mm.

ABSTRACT

Rosidah, Ria. 2018. Effect of Medium pH and Yeast Ekstract Concentration on Antibacterial Activity of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. Skripsi, Chemistry Department, Science and Technology Faculty Maulana Malik IbrahimState Islamic University of Malang. Chemistry Advisor:AnikMunatin S.T., M.P., Religi Advisor: Ahmad Abtokhi, M.Pd.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Bacteriocin, antibacterial activity

Lactobacillus plantarum is one of Lactic Acid Bacteria(LAB) can produce bacteriocin wich is a protein compound that have an antibacterial properties. Bacteriocin is used as a natural preservative in foods that are safe and non toxic. This study aims to determine the effect of pH media, yeast extract concentration and purification on antibacterial activity of bacteriocin.

This research uses Completely RandomizedDesign (CRD) with two factors, each factor consists 3 treathmens and 2 replication. pH (5,5; 6,0; 6,5) and yeast extract concentration (0,5%, 1%, 1,5%). The data obtained in the form of bacteriocin antibacterial activity showed by the width of inhibit zone. Data of inhibition zone (mm) were analized using Two Way Annova.

The result showed that Bacteriocin can inhibit the growth of *Staphilococcus aureus* and *Escherichia coli*. The maximum inhibition zone of bacteriocin in *Staphilococcus aureus* was 4.03 mm and in *Escherichia coli* 3.92 mm. The extent of the bacteriocin inhibition zone after purification was increased in *Staphylococcus aureus* by 3.18 mm to 5.08 mm and in *Escherichia coli* 3.43 mm to 3.81 mm.

مخلص البحث

رشيدة، ريا. ٢٠١٨ م. تأثير درجة الحموضة في وسائل الإعلام وتركيز خلاصة الخميرة على النشاط المضاد للبكتيريا ومبيد الجراثيم التي تنتجها العصية اللبنية. البحث العلم يلقسم الكيمياء بكلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. بمشرفة الكيمياء أنيكماتين ليسانس التكنولوجيا، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: العصية اللبنية، مبيد الجراثيم، والنشاط المضاد للبكتيريا

العصية اللبنية هو من أحد بكتريا حمض اللاكتيك (BAL) منتج مبيد جرثومي هي مركب البروتينات التي تصف مضاد للجراثيم. يستخدم مبيد الجراثيم مواد حافظة طبيعية في الأطعمة الآمنة وغير السامة. فهدف هذا البحث هو تألیم أثر درجة الحموضة ووسائل الإعلام، وتركيز زمستخلص الخميرة وتنقية النشاط المضاد للبكتيريا مبيد الجراثيم.

يستخدم هذا البحث العلمي تصميم الكتلة العشوائي العمودي (RAKF) تتكون من عاملين وهي درجة الحموض (٥,٥ ; ٦,٠ ; ٦,٥) وتركيز خلاصة الخميرة (٠,٥ % ; ١,٥ % ; ١,٥ %). ونتيجة البيانات هي النشاط المضاد للبكتيريا ومبيد الجراثيم الذي يدل على واسع منطقة المنعة. تحليل البيانات باستخدام تحليل التباين الثنائي.

يقدر مبيد الجراثيم على أن يمنع نمو المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية. وأعلى واسع منطقة المكورات العنقودية الذهبية من ٤.٠٣ ملم والإشريكية القولونية ٣.٩٢. وواسع منطقة مبيد الجراثيم بعد تنقية الزيادة في المكورات العنقودية الذهبية بنسبة ٣,١٨ ملم فصارت ٥,٨١ ملم وفي والإشريكية القولونية من ٣,٤٣ ملم إلى ٣,٨١ ملم.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَنْ لَّسْتُ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

“Dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezeki kepadanya” (QS.Al-Hijr : 20)

Asy-Syuyuti dan Jalaluddin (1505) dalam tafsir jalalain menjelaskan bahwa Allah SWT telah menjadikan di bumi keperluan-keperluan hidup bagi manusia berupa buah-buahan dan biji-bijian. Allah juga menjadikan makhluk-makhluk yaitu berupa hamba-hamba sahaya, binatang-binatang dan berbagai macam jenis ternak yang mana hanya Allah SWT yang memberirezeki kepada mereka. Rizki yang diberikan Allah kepada makhluknya dapat bermacam-macam bentuknya. Salah satu rizki tersebut yaitu berupa protein bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri.

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang dapat digunakan sebagai agen antibakteri pada makanan. Bakteriosin menurut Riadi (2015) adalah senyawa berprotein yang berasal dari bakteri dan menunjukkan aktivitas bakterisidal terhadap jenis bakteri yang berhubungan dekat dengan jenis bakteri penghasil bakteriosin dan atau bakteri lain. Penambahan bakteriosin dalam makanan menurut Yusuf (2013) selain untuk mencegah terjadinya pembusukan, juga berguna untuk memperpanjang waktu penyimpanan. Gautam dan Sharma (2009) menambahkan kelebihan bakteriosin diantaranya, tidak toksik dan mudah mengalami biodegradasi karena merupakan senyawa protein, tidak membahayakan mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan,

penggunaannya dapat mengurangi penggunaan bahan kimia pengawet dan dalam aplikasinya sangat fleksibel, dapat berupa strain kultur starter unggul yang terseleksi dan mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Menurut Marshall (2003) dibandingkan senyawa antimikroba lain bakteriosin bekerja lebih selektif.

Allah SWT menciptakan manusia dengan akal agar manusia dapat berfikir tentang ciptaanNya. Manusia diberikan kesempatan yang besar untuk mengambil manfaat dari hewan dan tumbuhan yang Allah ciptakan. Manusia diperintahkan untuk senantiasa bertadabbur dengan ayat-ayat qouliyah (Al-Qur'an) serta bertafakkur dengan ayat-ayat kauniyah (alam semesta) sehingga dapat memanfaatkan apa yang Allah ciptakan dengan bijaksana. Mengenai sejarah asal usul keberadaan bakteri diciptakan dan sebangsanya (binatang), dijelaskan melalui firman Allah SWT dalam kitab suci Al-Qur'an surah An-Nur ayat 45 sebagai berikut :

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ ۖ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ بَطْنِهِ ۚ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَىٰ أَرْبَعٍ ۚ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ ۚ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ

“”Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, Maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, Sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu” (Q.S.An-Nur : 45)

Berdasarkan tafsir ayat di atas menegaskan bahwa, Dan disamping bukti-bukti kekuasaan dan limpahan anugerah-Nya, Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air yang memancar sebagaimana Dia menciptakan tumbuhan dari air

tercurah. Selanjutnya Allah menjadikan hewan-hewan itu beraneka ragam jenis, potensi dan fungsinya, termasuk bakteri (Shihab, 2005).

Bakteriosin banyak dihasilkan oleh Bakteri Asam laktat (BAL). Bakteriosin yang dihasilkan BAL sangat potensial digunakan sebagai pengawet makanan alami (Singh, dkk., 2013) dan diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan bakteri patogen pada makanan penyebab food borne disease (Ahmad, dkk., 2014). Menurut Amezcuita dan Brashears (2002), BAL bermanfaat untuk peningkatan kualitas dan keamanan bahan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap mikroorganisme yang bersifat patogen. BAL adalah salahsatu dari banyak mikroorganisme yang dapat membentuk metabolit yang mempunyai daya antimikrobia. BAL menghasilkan beberapa komponen antimikrobia yaitu asam organik, karbondioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin. Namun menurut Ashraf dan Shah (2011) tidak semua bakteri asam laktat mampu menghasilkan bakteriosin. Salah satu bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan bakteriosin adalah *Lactobacillus plantarum* (Marselly, 2012).

L. plantarum merupakan bakteri asam laktat gram positif. Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri gram positif memiliki aktifitas hambat yang luas dalam menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif (De Vuyst dan Leroy, 2007). *L. plantarum* mampu menghambat mikroorganisme patogen pada bahan pangan dengan daerah penghambatan terbesar dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya (Jenie dan Rini, 1995). Ogunbowo (2003) dalam penelitiannya menyebutkan perbedaan spektrum hambat *L. plantarum* dengan *L. brevis*, yaitu *L. plantarum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri indikator sebanyak 24

dari 32 indikator diantaranya *E. coli* sebesar 12 mm dan *S.aureus* 8 mm sedang *L. brevis* hanya 21 bakteri indikator diantaranya *E. coli* sebesar 6 mm dan *S.aureus* 5 mm. Sunaryanto (2015) juga melakukan uji aktivitas bakteriosin yang diproduksi dari *L. laktis*, bakteri ini hanya mampu menghambat pertumbuhan *E. Coli* dengan luas hambatan 6 mm sedang *S.aureus* 6 mm.

Proses produksi bakteriosin dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya jenis bakteri produser, pH produksi, suhu produksi, keberadaan enzim proteolitik dan komposisi nutrisi media pertumbuhan (Todorof dan Dick, 2004). Salah satu media yang biasa digunakan untuk kultivasi bakteri asam laktat adalah medium MRS (Pal, dkk., 2010). MRS merupakan media yang paling sesuai untuk media pertumbuhan dan produksi bakteriosin (Meng, dkk., 2012). Ogunbanwo melakukan produksi bakteriosin pada berbagai media dan mendapatkan hasil tertinggi sebesar 6400 AU/mL terdapat pada penggunaan media MRS.

Produksi bakteriosin akan meningkat dengan meningkatnya kondisi pH sampai pH optimum dan kemudian akan mengalami penurunan (Jaya, 2004). Selain itu jumlah nutrisi yang ada pada media pertumbuhan awal potensial untuk membentuk biomassa akhir. Produksi bakteriosin yang optimal sering disimpan pada media yang berisiberbagai nutrisi diantaranya gula, sumber nitrogen, vitamin dan kalium fosfat, atau ketika pH media diatur (Vignolo, dkk., 1995). Jenis sumber nitrogen yang digunakan dalam medium produksi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan sel BAL, selanjutnya berpengaruh terhadap metabolisme produksi bakteriosin (De Vuyst, dkk, 2007). Diantara berbagai jenis sumber nitrogen diantaranya beefekstrak, meat ekstrak, yeast ekstrak, pepton, amoniumnitrat dan triammonium sitrat. Yeast ekstrak merupakan sumber nitrogen

yang mengandung berbagai asam amino yang berbeda yang penting dalam meningkatkan produksi plantaricin (Wala'a, 2011) yaitu bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum*.

Menurut Abbasiliasi (2017) penambahan yeast ekstrak pada produksi bakteriosin oleh *L. plantarum* ST194BZ dan *L. plantarum* ST23LD dapat meningkatkan aktivitas bakteriosin dari 6400 AU/ml menjadi 12800 AU/ml. Todorov (2005) melakukan produksi bakteriosin mendapatkan kondisi terbaik pada pH 5,5 atau 6,0, aktivitas bakteriosin mencapai 12800 AU/mL. Thirumurugan, dkk (2015) juga melakukan produksi bakteriosin oleh *L. plantarum* ATM11 dan mendapatkan hasil terbaik pada kondisi pH 6,5 dengan penambahan yeast ekstrak 1,5% aktivitas bakteriosin mencapai 4250 AU/mL. Kusmarwati (2014) yang melakukan produksi bakteriosin pada kondisi pH 6,0 dengan penambahan yeast ekstrak 0,5% menghasilkan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* dengan luas zona hambat 5 mm. Liliek (2013) dalam produksi bakteriosin *L. plantarum* DJ3 menggunakan konsentrasi yeast ekstrak 2% mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* hingga 4 mm dan *S. aureus* 5.33 mm.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dijabarkan, dapat diketahui bahwa pH media dan konsentrasi yeast ekstrak mempunyai peranan penting pada proses produksi bakteriosin. pH media dan konsentrasi yeast ekstrak yang baik diharapkan dapat memberikan hasil terbaik pada produksi bakteriosin dan aktivitasnya sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi terbaik pH media dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh pH media dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*?
2. Bagaimana pengaruh purifikasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh pH media dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*
2. Untuk mengetahui pengaruh purifikasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. *Lactobacillus plantarum* yang digunakan berasal dari Universitas Gadjah Mada
2. Variasi pH media 5,5; 6,0 dan 6,5
3. Variasi konsentrasi yeast ekstrak(0,5%), (1,0%) dan (1,5%)
4. Bakteri patogen yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri bakteriosin adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah didapatkannya kondisi terbaik pH media dan konsentrasi yeast ekstrak serta purifikasi terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum*



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteriosin

يَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوْا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ ﴿١٦٨﴾

‘‘Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan; karena Sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu’’ (Q.S. Al-Baqarah;168)

Sebagai seorang mukmin (orang yang beriman) sudah seharusnya mengkonsumsi sesuatu baik makanan maupun minuman yang sudah mendapat label Halal oleh Allah dan Rasul-Nya. Namun, tidak hanya cukup makan dan minum apa-apa yang dihalalkan oleh Syari’at saja melainkan makanan dan minuman itu hendaknya juga *Tayyibah* (Baik). Sesama mukmin haram hukumnya membahayakan mukmin lainnya, entah ia menjual, memberi atau menafkahi sesuatu yang haram dan berbahaya. Ibnu Katsir menjelaskan bahwa makna ayat Al Baqarah ayat 168 maksudnya adalah Allah swt telah membolehkan (menghalalkan) seluruh manusia agar memakan apa saja yang ada dimuka bumi, yaitu makanan yang halal, baik, dan bermanfaat bagi dirinya sendiri yang tidak membahayakan bagi tubuh dan akal pikiranya (Al Ilmiyah. 2007).

Bakteriosin merupakan substansi protein yang mempunyai berat molekul kecil serta memiliki aktivitas bakterisidal (Abdelbasset, dkk., 2008). Bakteriosin memiliki banyak keunggulan dibanding senyawa kimia lain, diantaranya dapat digunakan sebagai biopreservatif alami yang aman dan tidak toksik, mudah mengalami biodegradasi karena berupa senyawa protein, tidak membahayakan

mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan, penggunaan bakteriosin dapat mengurangi penggunaan bahan kimia pengawet dan dalam aplikasinya sangat fleksibel yaitu dapat berupa strain kultur starter unggul yang terseleksi dan mampu menghasilkan senyawa antimikroba (Gautam dan Sharma, 2009). Bakteriosin sangat potensial digunakan untuk mengendalikan beberapa bakteri kontaminan.

Klaenhammer (1993) mengelompokkan bakteriosin menjadi 3 kelas, kelas I bakteriosin dengan peptida kecil $< 5\text{kDa}$ disebut dengan golongan lantibiotik seperti nisin, laktisin 481, laktosin S dan karnosin U149. Kelas II yaitu bakteriosin dengan peptide kecil non lantibiotik dengan berat molekul $< 10\text{ kDa}$, bersifat tahan panas, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dan $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, yang termasuk bakteriosin kelas II diantaranya diplokokin, laktokokin A, laktosin 27, laktasin B, laktasin F, sakasin A, pediosin PA-1, leukosin A-UAL 187 dan karnobakteriosin. Sedangkan bakteriosin kelas III yaitu non lantibiotik dengan peptide besar $> 30\text{ kDa}$ yang peka terhadap panas, inaktif dalam suhu $60\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 10-15 menit.

Bakteriosin diproduksi oleh Bakteri Asam Laktat (BAL), didefinisikan sebagai protein yang aktif secara biologi atau kompleks protein (agregat protein, protein lipokarbohidrat, glikoprotein) yang disintesis secara ribosomal (Leroy, 2007). Pada banyak kasus mampu melawan bakteri yang biasanya berkerabat dekat dengan mikroorganisme penghasilnya. Beberapa bakteriosin yang berasal dari bakteri Gram positif memperlihatkan aktivitas bakterisidal dengan spektra penghambat yang luas dan sangat berguna sebagai agen antibakterial untuk berbagai aplikasi praktik (Hata, dkk., 2010). Beberapa generasi yang memproduksi bakteriosin adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*

,*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* (Utami, 2011). Kusmiati (2002) melaporkan beberapa spesies dari genus *Lactobacillus* yang dapat menghasilkan bakteriosin seperti lactocin 27 oleh *L. helveticus* LP27, lactacin F oleh *L. acidophilus* 88, plantacin B oleh *L. plantarum* NCDO 1193, sakacin A oleh *L. sake* Lb 706, brevicin 37 oleh *L. brevis* B37 dan dari kelompok lain nisin dihasilkan oleh *Lactococcus lactis*. Produksi bakteriosin umumnya dilakukan dalam substrat cair. Secara umum kondisi optimum produksi bakteriosin dipengaruhi oleh fase pertumbuhan, pH media, suhu inkubasi, jenis sumber karbon, jenis sumber nitrogen, dan konsentrasi NaCl (Usmiati, 2007).

2.2 Bakteri Asam Laktat (BAL)

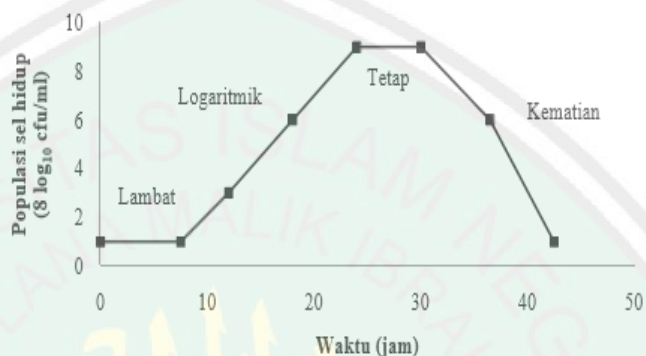
Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah bakteri yang menguntungkan karena dapat digunakan dalam proses pengawetan bahan pangan. BAL termasuk dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat maupun batang, dan menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama memfermentasi. BAL dapat tumbuh pada suhu 5-45 °C dan toleran terhadap kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada pH 4,4. Pertumbuhannya optimum pada pH 5,5–6,5 dan membutuhkan nutrisi kompleks, seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat (Axelsson, 2004). Metabolit BAL yang berfungsi sebagai senyawa antimikroba antara lain asam organik (asam laktat dan asam asetat), bakteriosin, hidrogen peroksida (Ouwehand dan Vesterlund, 2004). BAL merupakan kelompok bakteri yang paling banyak menghasilkan bakteriosin. Secara umum, bakteriosin yang disekresikan oleh BAL merupakan peptida kationik kecil dengan 30 sampai 60

residu asam amino dan tahan terhadap pemanasan (Balasubramanyam, dkk., 1995).

Berdasarkan tipe fermentasi BAL terbagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi gula, sedangkan kelompok heterofermentatif menghasilkan asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetaldehid, diasetil (Fardiaz, 1995). BAL pada pangan fermentasi dapat menimbulkan efek preservatif disebabkan oleh kondisi asam yang terbentuk selama pemrosesan dan selanjutnya selama penyimpanan. Efek asam tersebut diakibatkan adanya konversi karbohidrat menjadi asam organik (asam laktat dan asam asetat) dan menurunkan pH produk selama fermentasi (Vuyst dan Vandamme, 1994). Menurut Rahayu, dkk., (1999) dalam Yuliana (2008) asam yang dihasilkan dapat mencegah pertumbuhan mikroba lain yang tidak dikehendaki selama proses fermentasi berlangsung. Keberhasilan proses fermentasi dipengaruhi oleh keberhasilan dalam mengoptimalkan faktor-faktor dari pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Selain itu setiap bakteri memiliki perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh atau beradaptasi juga metabolit yang dihasilkan (Yuliana, 2008).

Pertumbuhan sel dan pembentukan produk dapat dipengaruhi oleh lingkungan. Pelczar dan Chan (2007) menyatakan bahwa ketika bakteri yang tumbuh dalam sistem tertutup seperti tabung reaksi, populasi sel hampir selalu menunjukkan dinamika pertumbuhan sebagai berikut, awalnya sel menyesuaikan diri dengan media baru (fase lag) sampai mereka mulai membelah diri secara terus menerus melalui proses pembelahan biner yaitu fase eksponensial (fase log),

ketika pertumbuhan mereka menjadi terbatas, sel-sel berhenti membelah (fase stasioner), sampai akhirnya sel-sel bakteri menunjukkan hilangnya viabilitas (fase kematian). Sumbu X dan sumbu Y dalam kurva pertumbuhan dinyatakan sebagai perubahan jumlah sel yang berbanding dengan waktu (Todar, 2009).

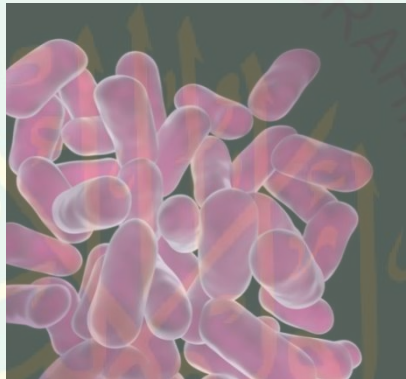


Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan bakteri
Sumber: Todar (2009)

2.3 *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum merupakan salah satu jenis BAL homofermentatif dengan pertumbuhan yang optimal pada suhu 30-37 °C serta pada pH 5-7 (Emanuel, dkk., 2005). *L. plantarum* berbentuk batang dengan ukuran 0,5-1,5 sampai 1,0-10 µm, tidak bergerak (nonmotil), memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif anerob, mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. Dalam media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opaque, konveks, dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat (Kuswanto dan Sudarmadji, 1998).

L. plantarum memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk dalam keadaan asam (Delgado, dkk., 2001). Selain itu juga berguna dalam pembentukan asam laktat, penghasil hidrogen peroksida tertinggi dibandingkan bakteri asam laktat lainnya dan menghasilkan bakteriosin yang merupakan senyawa protein yang bersifat bakterisidal (James, dkk., 1992). Ogunbanwo (2003) melakukan produksi bakteriosin dari *L. plantarum* F1 dan memperoleh hasil produksi maksimum pada kondisi pH 2,0-6,0 dengan aktivitas penghambatan *E. coli* mencapai 12 mm.



Gambar 2.2 *Lactobacillus Plantarum*

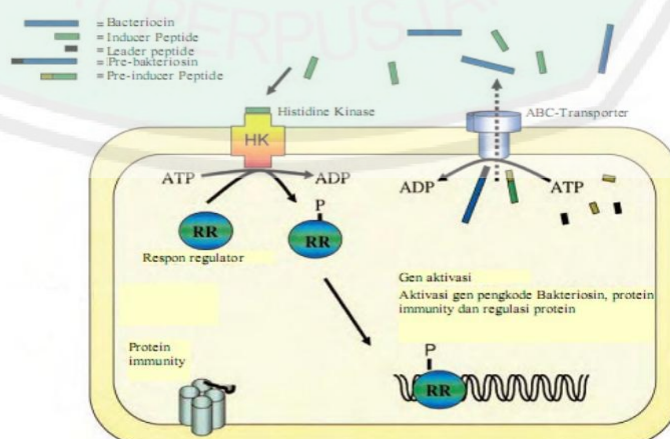
Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *Lactobacillus plantarum* diklasifikasikan sebagai berikut (Fellis dan Dellaglio, 2008):

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

2.4 Biosintesis Bakteriosin

Bakteriosin disintesis selama fase eksponensial pertumbuhan sel mengikuti pola klasik sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstrakromosomal dan dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama pH. Umumnya bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal, sedangkan kelompok antibiotik disintesis secara ribosomal sebagai prepeptida kemudian mengalami modifikasi. Sekresi prepeptida dilakukan pada fase eksponensial dan diproduksi secara maksimal pada fase stasioner (Hafsan, 2014).

Prinsip regulasi sintesis bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas. Suatu gen menyandi molekul messenger RNA (mRNA), yang akhirnya menghasilkan pembentukan protein. Sebagai alternatif, produk dari gen dapat berupa ribosomal RNA (rRNA) atau transfer RNA (tRNA). Semua tipe RNA terlibat dalam proses sintesis protein rRNA adalah bagian integral dari ribosom dan merupakan mesin seluler untuk sintesis protein. Sintesis protein diawali dengan proses transkripsi dimana urutan DNA dijadikan mRNA, kemudian informasi yang terdapat di dalam mRNA tersebut ditranslasikan menjadi urutan asam amino spesifik yang membentuk protein (Bariyah, 2012).



Gambar 2.3 Mekanisme sintesis bakteriosin selama metabolisme sel BAL
Sumber: Drider, dkk., (2006)

2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Produksi Bakteriosin

Proses produksi bakteriosin dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu jenis bakteri produser, media, nutrisi, pH produksi, suhu produksi dan keberadaan enzim proteolitik (Todorov dan Dicks, 2004).

2.5.1 Media

Produksi bakteriosin biasanya dilakukan pada media sintetik seperti MRSB (de Man Rogosa dan Sharpe Broth), TGE (Tryptone Glucose Extract Yeast), atau media sintetik lainnya. Namun, pada umumnya media sintetik yang digunakan dalam produksi bakteriosin yang dihasilkan BAL adalah media MRSB (Abubakar, 2015). MRS merupakan media yang paling sesuai untuk media pertumbuhan dan produksi bakteriosin (Meng, dkk., 2012).

2.5.2 pH produksi

Faktor pH produksi akan mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri selanjutnya akan mempengaruhi produksi bakteriosin. Produksi bakteriosin akan meningkat dengan meningkatnya pH sampai pH optimum dan kemudian akan mengalami penurunan (Jaya, 2004). *L. plantarum* merupakan salah satu jenis BAL dengan pertumbuhan optimal pada pH 5-7 (Emanuel, dkk., 2005).

2.5.3 Suhu

Sementara itu, faktor suhu mempunyai dua pengaruh yang bertentangan yaitu meningkatkan produksi bakteriosin, tetapi juga dapat membunuh bakteri asam laktat penghasil bakteriosin. Suhu optimum merupakan batas keduanya (Caldera dan Olivera 2004). Peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi bakteriosin (Jaya, 2004).

Menurut Emanuel, dkk., (2005) *L. plantarum* merupakan BAL homofermentatif dengan pertumbuhan optimal pada suhu 30-37 °C (Emanuel, dkk., 2005).

2.5.4 Nutrisi

Beberapa komponen nutrisi penyusun media kultur bakteri asam laktat yaitu glukosa dan gliserol sebagai sumber karbon dan energy, yeast extract dan beef extract sebagai sumber vitamin dan nitrogen, pepton/tripton sebagai sumber asam amino, N, S, dan P, serta berbagai mineral KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , dan FeSO_4 serta CaCO_3 sebagai penstabil pH (Kamoun, 2009). Yeast ekstrak merupakan sumber nitrogen yang mengandung berbagai asam amino berbeda yang penting dalam meningkatkan produksi bakteriosin (Wala'a, 2011).

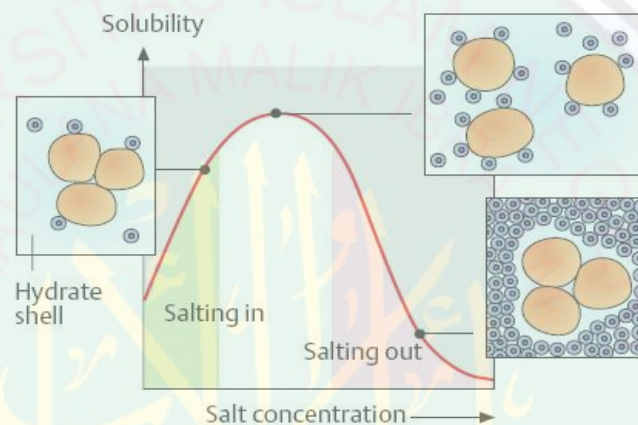
2.5.5 Enzim Proteolitik

Enzim proteolitik atau yang sering disebut dengan protease merupakan berbagai jenis enzim yang mencerna protein menjadi unit-unit yang lebih kecil dimana enzim secara umum bertugas sebagai katalisator dengan cara menurunkan energi aktivasi di dalam sel, bersifat khas (Murray, 2006). Dalam penelitian Ogunbanwo (2003) adanya enzim proteolitik menyebabkan hilangnya aktivitas bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *L. plantarum* dan *L. brevis*.

2.6 Purifikasi

Purifikasi atau pemurnian dilakukan setelah mengekstraksi protein dari suatu sampel untuk menghilangkan pengotor yang dapat mengganggu kemurnian dan kinerja protein yang diinginkan. Protein umumnya dimurnikan atau lebih tepatnya diendapkan dengan metode presipitasi ionik menggunakan ammonium sulfat. teknik presipitasi amonium sulfat adalah mereduksi kelarutan protein dalam air dengan mekanisme yang disebut *salting in* dan *salting out*. *Salting in*

adalah proses ionisasi protein oleh sejumlah garam amonium sehingga kelarutan protein dalam pelarut meningkat karena molekul protein tertarik ke arah pelarut. *Salting out* adalah mekanisme pengendapan protein akibat berkurangnya molekul pelarut yang dibutuhkan untuk melarutkan protein, karena meningkatnya konsentrasi garam. Berikut proses pengendapan protein dengan amonium sulfat (Evilgenius, 2015):



Gambar 2.4 Proses pengendapan protein dengan amonium sulfat
Sumber: Evilgenius (2015)

Pengaruh penambahan garam terhadap kelarutan protein berbeda-beda, tergantung pada konsentrasi dan jumlah muatan ionnya dalam larutan. Semakin tinggi konsentrasi dan jumlah muatan ionnya, semakin efektif garam dalam mengendapkan protein (Yazid dan Nursanti, 2006). Selanjutnya dilakukan Dialisis untuk menghilangkan pengotor non-protein yaitu garam amonium sulfat yang telah digunakan. Garam-garam tersebut dapat menjadi inhibitor aktivitas enzim atau mengurangi kelarutan protein sehingga harus dipisahkan (Evilgenius, 2015).

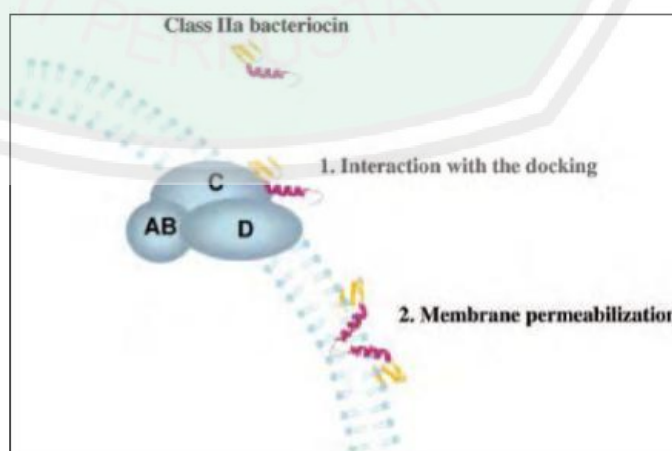
2.7 Penentuan Aktivitas Antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri dapat ditentukan dengan 2 metode yaitu difusi dan dilusi. Menurut pratiwi (2008) ada 4 metode difusi diantaranya metode *disk diffusion (test Kirby dan Bauer)*, *E-test*, *ditch-plate technique* dan *cup plate technique*:

- a. Metode *disk diffusion (test Kirby dan Bauer)* menggunakan piringan yang berisi agen antibakteri, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antibakteri dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih menunjukkan adanya aktivitas hambat mikroorganisme oleh agen antibakteri.
- b. Metode *E-test* digunakan untuk mengestimasi Kadar Hambat Minimum (KHM). Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antibakteri dari kadar terendah sampai kadar tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme. Area jernih menunjukkan kadar agen antibakteri yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme.
- c. Metode *ditch-plate technique*. Sampel uji berupa agen antibakteri yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji maksimum 6 macam digoreskan ke arah parit yang berisi agen antibakteri tersebut.
- d. Metode *cup plate technique* ini serupa dengan *disk diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme dan pada sumur diberi agen antimikroba yang akan diuji.

2.8 Mekanisme Aktivitas Bakteriosin

Aktivitas bakteriosin umumnya mengganggu dinding sel atau membran sitoplasma sel dengan menghambat biosintesis dinding sel atau menyebabkan pembentukan pori sehingga dapat menyebabkan lisis hingga kematian sel (Sullivan, dkk., 2002). Mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroba oleh bakteriosin adalah sebagai berikut, pertama molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel, kemudian proses kontak ini mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat, selanjutnya ketidakstabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap PMF (Proton Motive Force) (Barefoot, dkk., 1993) Kebocoran yang terjadi akibat pembentukan lubang pada membran sitoplasma ditunjukkan oleh adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler. Efeknya menyebabkan pertumbuhan sel terhambat dan menghasilkan proses kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin. Gambar 2.5 menunjukkan mekanisme aksi penghambatan bakteriosin terhadap bakteri target (Drider, dkk., 2006) :



Gambar 2.5 Mekanisme bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen
Sumber: Drider, dkk., 2006)

2.9 Bakteri Patogen

Bakteri patogen dapat dibedakan menjadi bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Perbedaan kedua kelompok bakteri tersebut didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam presentase lebih tinggi daripada yang dimiliki oleh bakteri Gram positif. Selain itu dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis jika dibandingkan dengan dinding sel bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri Gram negatif, namun mengandung lebih sedikit lipid (Pelczar dan Chan, 2007). Beberapa bakteri yang merupakan bakteri patogen diantaranya adalah famili *Enterobacteriaceae* yaitu *Salmonella*, *Escherichia*. Bakteri patogen lainnya adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, dan *Pseudomonas* yang merupakan jenis bakteri penyebab kebusukan pada makanan (Fardiaz, 1989).

2.7.1 *Escherichia coli*

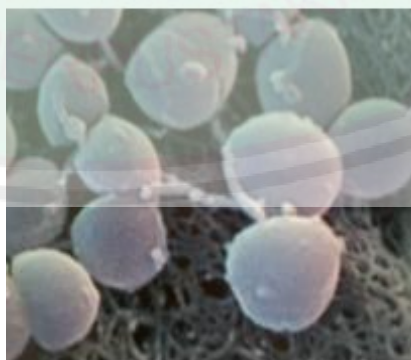


Gambar 2.6 Bakteri *Escherichia coli*
Sumber: Black (2005)

Escherichia coli merupakan bakteri indikator kualitas air minum karena keberadaannya di dalam air mengindikasikan bahwa air tersebut terkontaminasi oleh feses, yang kemungkinan juga mengandung mikroorganisme enterik patogen lainnya (Tortora dkk., 2004). *E. coli* sensitif terhadap suhu rendah, seperti suhu pasteurisasi (Ray dan Bhunia, 2008). Bakteri ini dapat tumbuh optimum pada pH 7,0-7,5 (Frazier dan Westhoff, 1998). Abu bakar dkk., (2015) pada penelitian nya yaitu produksi bakteriosin dan uji aktivitas hambat terhadap bakteri patogen mendapatkan hasil bahwa, secara keseluruhan ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan memiliki aktivitas untuk menghambat *E. coli* sebesar 707,66 hingga 853,01 AU/mL. Berikut klasifikasi bakteri *E. coli* (Levinson. 2008):

Domain: Bacteria
 Filum: Proteobacteria
 Kelas: Gammaproteobacteria
 Ordo: Enterobacteriales
 Famili: Enterobacteriaceae
 Genus: *Escherichia*
 Spesies: *E. coli*

2.7.2 *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.7 *Staphylococcus aureus*
sumber: Madigan, dkk., (2009)

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang memberi respon berwarna biru keunguan jika dilakukan uji pewarnaan Gram (Tortora, dkk., 2006). *S. aureus* termasuk famili Micrococcaceae, berbentuk kokus yang terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan tetrad atau berkelompok, seperti buah anggur dengan diameter berkisar 0,5-1,5 μm , anaerob fakultatif, tidak bergerak, tidak berspora dan pada umumnya termasuk katalase positif (Holt, dkk., 1994). Supardi dan Sukanto (1999) menambahkan bahwa *S. aureus* dapat tumbuh optimum pada rentang suhu 35-37 °C dengan suhu minimum 6,7 °C dan suhu maksimum 45,5 °C. Bakteri dapat tumbuh pada pH 4,0-9,8 dengan pH optimum sekitar 7,0-7,8. Ogunbanwo (2003) melakukan produksi bakteriosin dari *L. plantarum* F1 dan mendapatkan hasil bahwa *L. plantarum* F1 dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan luas hambatan mencapai 8 mm pada suhu 37 °C.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada Bulan Juli-Desember 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah shaker incubator, laminar flow, sentrifuse mikro, spektrofotometer, hot plate, autoclaf, micropipette, vortex, neraca analitik, pH indikator universal, pH meter, alumunium foil, turbidity meter, colony counter, jarum ose, pipet tetes, erlemeyer, stirer, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, bunsen dan kantung selulosa.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat *Lactobacillus plantarum*, bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Bahan-bahan kimia NaCl, NaOH, alkohol 70%, YE (*Yeast Extract*) 1,0% dan 1,5% dan 2,0%, aquades, kapas, spiritus, Amonium Sulfat 60%, BaCl₂ 0,1 M, Bovin Serum Albumin (BSA), tembaga (II) sulfat dan kalium natrium ttrat. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah MRS (*deMann Rogosa and Sharpe*) broth, MRS (*deMann Rogosa and Sharpe*) agar, NA (*Nutrient agar*) dan NB (*Nutrient broth*).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) yang terdiri dari dua faktor, yaitu pH (P) dan konsentrasi yeast ekstrak (Y). Kombinasi perlakuan pH dan konsentrasi yeast ekstrak dapat digambarkan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Antara pH dan Konsentrasi Yeast Ekstrak

P / Y	Yeast Ekstrak 0,5% (v/v) (Y ₁)	Yeast Ekstrak 1,0% (v/v) (Y ₂)	Yeast Ekstrak 1,5% (v/v) (Y ₃)
pH 5,5 (P ₁)	P ₁ Y ₁	P ₁ Y ₂	P ₁ Y ₃
pH 6,0 (P ₂)	P ₂ Y ₁	P ₂ Y ₂	P ₂ Y ₃
pH 6,5 (P ₃)	P ₃ Y ₁	P ₃ Y ₂	P ₃ Y ₃

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pH dan konsentrasi yeast ekstrak sedangkan untuk variabel terikatnya adalah aktivitas antibakteri bakteriosin. Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian secara deskriptif kualitatif dan kuantitatif melalui dua tahap pengujian. Tahap pertama bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap produksi bakteriosin. variasi pH yang digunakan adalah 5,5; 6,0 dan 6,5 sedangkan konsentrasi yeast ekstrak 0,5%; 1,0% dan 1,5%. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil produksi terbaik dipurifikasi dan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Tahap kedua yaitu purifikasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis menggunakan kantung selulosa. Bakteriosin yang telah dipurifikasi selanjutnya diuji aktifitas antibakterinya menggunakan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.. Uji aktivitas antibakteri diulang sebanyak 3 kali.

3.4 Tahap-Tahap Penelitian

Tahapan pada penelitian ini adalah:

1. Sterilisasi Alat
2. Pembuatan media MRSA (*deMann, Rogosa Sharpe Agar*), MRSB (*deMann, Rogosa Sharpe Broth*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*).
3. Regenerasi Bakteri
4. Pembuatan Inokulum
5. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *L. plantarum*
6. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri
7. Proses Produksi Bakteriosin
8. Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis
9. Penentuan Konsentrasi Protein
10. Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriosin
11. Analisis Data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat (Muhibah, 2013)

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan dengan cara dibungkus menggunakan aluminium foil atau kapas. Kemudian dimasukkan kedalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

3.5.2 Pembuatan Media MRSA (*deMann Rogosa Sharpe Agar*), MRSB (*deMann Rogosa Sharpe Broth*), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*)

3.5.2.1 Media MRSA (Korawit Chaisu, 2013)

Media MRSA (*deMann, Rogosa and Sharpe Agar*) ini dibuat dengan menimbang 6,82 gram MRSA kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media MRSA ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum*.

3.5.2.2 Pembuatan Media MRSB (Korawit Chaisu, 2013)

Media MRSB (*deMann, Rogosa and Sharpe Broth*) ini dibuat dengan menimbang 5,6 gram MRSB kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.2.1 Pembuatan Media NA (Muhibah, 2013)

Media NA dibuat dengan cara diambil sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 100 mL akuades dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil. Suspensi dipanaskan hingga mendidih dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara aseptik. Media NA disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media dibiarkan pada suhu ruang selama 1 jam

dengan posisi miring. Selanjutnya media digunakan untuk regenerasi bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

3.5.2.4 Pembuatan Media NB (Rahmawati, 2014)

Media NB diambil sebanyak 1,8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil. Dipanaskan hingga mendidih dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan kapas, disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Selanjutnya media digunakan untuk stok inokulum.

3.5.3 Regenerasi Bakteri

3.5.3.1 Regenerasi *Lactobacillus plantarum* (Usmiati, 2007)

L. plantarum diinokulasi 2 ose isolat ke dalam media MRSA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam sehingga diperoleh kultur aktif. *Lactobacillus plantarum* yang telah diregenerasi digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

3.5.3.2 Regenerasi *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Muhibah, 2013)

Biakan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diambil 1 ose kemudian digoreskan pada media NA miring secara aseptik. Tabung didekatkan ke api saat menggoreskan bakteri. Tabung kemudian ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.5.4 Pembuatan Inokulum

3.5.4.1 Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum* (Khairiyah, 2014)

Dua ose biakan *L. plantarum* dipindahkan ke dalam 50 mL media MRSB, kemudian di goyang dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 18 jam sampai fase eksponensial pada suhu 37°C.

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

Diambil 1 ose bakteri *S. aureus* dengan menggunakan kawat ose steril, lalu ditanamkan pada media NA miring dengan cara menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Untuk pembuatan stok kultur bakteri *E. coli* dilakukan cara yang sama seperti pada bakteri *S. aureus*.

3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *L. plantarum* (Setianingsih, 2010)

Biakan *L. plantarum* yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 2% dan diinokulasikan kedalam 200 mL media MRSB. Pertumbuhan bakteri diamati dengan cara memipet 2 mL suspensi bakteri dan dilakukan pengukuran Optical Density (OD) berdasarkan nilai Absorbansi setiap 2 jam selama 34 jam. Pengukuran dilakukan hingga fase stasioner menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Pengenceran dilakukan jika nilai OD ≥ 1 untuk menghindari penyimpangan data dikarenakan sampel yang terlalu pekat.

Nilai OD = Nilai Absorbansi (A) x faktor pengenceran (FP).....(3.1)

3.5.6 Penghitungan Jumlah Sel Bakteri (Harmita, dkk., 2008)

Tabung reaksi sebanyak 10 buah diisi dengan NaCl 0,9% steril sebanyak 9 mL. Inokulum bakteri *L. plantarum* dalam media MRSB diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung pertama lalu dihomogenisasi dengan cara dikocok menggunakan *bluetip* dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Larutan dari tabung pertama dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung kedua sehingga diperoleh pengenceran tingkat kedua (10^{-2}). Demikian seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-10} . 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.

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

3.5.7 Produksi Bakteriosin Media MRSB (Ogunbanwo, 2003)

Isolat *L. plantarum* diinokulasi sebanyak 1 ml ke dalam 25 ml MRSB yang masing-masing berisi nutrisi *yeast ekstrak* dengan konsentrasi 0,5%; 1,0%; 1,5%. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C sampai awal fase stasioner dengan kondisi pH 5,5; 6,0 dan 6,5. Kemudian 25 ml kultur disentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Kultur dinetralkan dengan NaOH 1 M hingga kondisi pH 6,2 untuk menghilangkan efek antimikroba dari asam organik. Selanjutnya supernatan netral dimurnikan dengan amonium sulfat dan dialisis.

3.5.8 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis (Ogunbanwo, 2003)

Purifikasi parsial bakteriosin dilakukan pada supernatan antimikroba netral yang berasal dari *L. plantarum*. Serbuk ammonium sulfat ditambahkan secara bertahap dengan konsentrasi 60% ke dalam supernatan antimikroba netral untuk mendapatkan protein, kemudian di homogenkan secara perlahan menggunakan stirrer pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu supernatan dipindahkan ke tabung sentrifuge dan dilakukan sentrifugasi 10000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatan dibuang dan didapatkan presipitat bakteriosin kasar. Presipitat bakteriosin kasar tersebut kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M pH netral dan dilakukan dialisis. Dialisis dilakukan dengan memasukkan membran dialisis (berupa kantong selofan yang memiliki ukuran pori 14 KDa) yang telah diisi dengan presipitat bakteriosin kasar yang telah ditambahkan dengan buffer kalium fosfat 0,2 M ke dalam buffer kalium fosfat 0,05 M. Proses tersebut dilakukan diatas stirrer pada suhu 4°C selama 24 jam selanjutnya diukur konsentrasi protein bakteriosin.

3.5.9 Penentuan Konsentrasi Protein Bakteriosin Metode Biuret (Martono, 2013)

3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/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 pada suhu kamar. Diukur absorbansi masing-masing larutan dengan spektrofotometer pada λ 550 nm. Setelah diperoleh kurva standar dilakukan pengukuran protein bakteriosin

3.5.9.2 Pengukuran Konsentrasi Protein Bakteriosin

Sampel bakteriosin diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml. Campuran larutan ini kemudian divortex agar homogen. Dengan demikian maka sampel mengalami pengenceran 10x. Selanjutnya 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 selanjutnya siap diukur absorbansinya pada λ 550 nm. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimikroba.

3.5.10 Uji Aktivitas Antimikroba Metode Difusi Cakram (Fitriyah, 2015)

Uji antibakteri dilakukan berdasarkan uji Kirby-Bauer dengan menggunakan kertas cakram. Media NA dipanaskan hingga mencair kemudian didinginkan sampai suhu 37°C dan tuang ke dalam cawan yang berisi masing-masing 50 μ l inokulum *S. aureus* dan *E. coli*. Kertas cakram dibuat dari kertas whatman dengan diameter 6 mm. Secara aseptik kertas cakram steril direndam dalam 50 μ l ekstrak kasar bakteriosin selama 30 menit. Kemudian kertas cakram diambil dengan pinset steril dan diletakkan diatas media NA. Selanjutnya diinkubasi selama 18. Luas zona hambat diukur menggunakan jangka sorong.

Zona hambat = zona keseluruhan – luas cakram.....(3.3)

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan Two Way Analisa Varian (ANOVA) menggunakan SPSS 18 untuk menguji pengaruh variasi pH dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin oleh *L. plantarum*. Kemudian

dilanjutkan dengan purifikasi dan uji aktivitas antibakteri menggunakan bakteri indikator *S. aureus* dan *E. coli* untuk mendapatkan zona hambat sebagai aktivitas antibakteri bakteriosin.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini diawali dengan pembuatan media pertumbuhan, peremajaan, pembuatan inokulumserta kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*. Fase stasioner menunjukkan hasil pada jam ke 26, waktu ini digunakan untuk produksi bakteriosin. Bakteriosin dipurifikasi dan diukur konsentrasi protein nya. Bakteriosin diuji aktivitas hambatnya terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Escheria coli*. Besarnya aktivitas bakteriosin dilihat dari luas zona hambat yang dihasilkan.

4.1 Pembuatan Media

Media berfungsi untuk menumbuhkan mikroba, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah mikroba, dimana dalam proses pembuatannya harus disterilisasi dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media (Partic, 2008). Dalam penelitian ini digunakan media *MRSA* (*deMann Rogosa Sharpe Agar*), *MRSB* (*deMannRogosa Sharpe Broth*), *NA* (*Nutrient Agar*) dan *NB* (*Nutrient Broth*). *MRS* merupakan media yang paling sesuai untuk media pertumbuhan dan produksi bakteriosin (Mengdkk., 2012). Media *MRS* mengandung nutrisi diantaranya polysorbat, asetat, magnesium dan mangan yang dibutuhkan oleh bakteri *Lactobacillus* (Rustan, 2013). *NA* dan *NB* digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme yang tidak selektif. Umumnya digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji produk pangan dan untuk pertumbuhan sampel pada uji bakteri (Partic, 2008).

MRSA dan *MRSB* dalam penelitian digunakan untuk peremajaan dan inokulum *L. plantarum*. Sedangkan *NA* dan *NB* digunakan untuk peremajaan dan inokulum bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Sebelum pemakaian, media disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi alat maupun media sangat penting untuk menghindari adanya kontaminasi produk (Diasy, 2012). Media siap digunakan untuk peremajaan dan pembuatan inokulum.

4.2 Peremajaan dan Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum*

Peremajaan bakteri merupakan hal penting yang harus dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri yang baru dan muda sehingga mampu berkembang biak dengan baik dan optimal dalam proses fermentasi (Mas'ud, 2013). Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan bakteri yang semula inaktif menjadi aktif kembali. Kondisi bakteri yang inaktif menjadi kurang optimal jika digunakan pada pembuatan inokulum (Zein, 2017). Isolat *L. plantarum* diremajakan di dalam media *MRSA* dan disimpan dilemari pendingin untuk menghambat pertumbuhan bakteri menuju ke fase kematian.

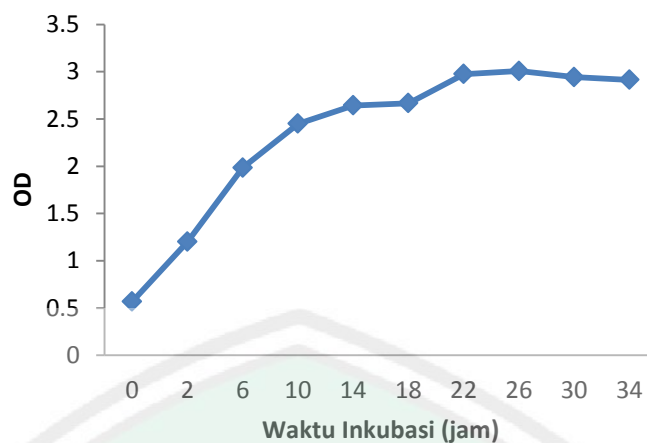
Peremajaan *L. plantarum* dilakukan didalam laminar dengan menggunakan kawat ose yang sudah dipanaskan diatas bunsen untuk mematikan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan (Waluyo, 2011). Sebanyak satu ose isolat bakteridi *streak* pada media *MRSA* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Menurut Sutrisna (2012) pada jam ke-48 ini dimungkinkan bakteri *L. plantarum* dalam fase eksponensial (logaritmik). *L. plantarum* dapat diinokulasikan pada media *MRSB* setelah jam ke-48 untuk pembuatan inokulum.

Inokulum merupakan biakan bakteri yang ditumbuhkan di media *MRSB* (Zein, 2017). Pembuatan inokulum pada media *MRSB* bertujuan untuk

menumbuhkan bakteri yang siap digunakan sebagai starter dalam suatu proses fermentasi. Pembuatan stok inokulum dilakukan secara aseptis didalam *laminar air flow* untuk menghindari kontaminasi dari bakteri lain. Untuk produksi bakteriosin menggunakan inokulum dengan Optical Density (OD) 0,6 yang setara dengan jumlah sel bakteri $63,5 \times 10^7$ Cfu/ml. Jumlah tersebut diperoleh dari perhitungan jumlah sel bakteri yang dilakukan dengan metode hitung cawan Total Plate Count (TPC). Prinsip dari metode TPC ini adalah menumbuhkan sel mikroorganisme pada media agar, sehingga mikroorganisme akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Kelebihan dari metode ini yaitu dapat diketahui adanya mikroba jenis lain yang terdapat pada media dan dapat mengetahui jumlah mikroba yang dominan (Wordpress, 2018).

4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

Kurva pertumbuhan menunjukkan siklus hidup dari bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari peningkatan massa atau jumlah sel total (Suwayvia, 2017). Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan bakteri *L. plantarum* yang dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan waktu optimum *L. plantarum* dalam menghasilkan metabolit sekundernya serta dapat digunakan dalam menentukan lamanya waktu inkubasi *L. plantarum* selama proses fermentasi.



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *L. plantarum*

Pertumbuhan bakteri ditandai dengan meningkatnya nilai OD (Optical Density) atau kekeruhan. Semakin tinggi nilai OD semakin banyak jumlah sel bakteri. Gambar 4.1 menunjukkan bahwa selama 34 jam inkubasi *L. plantarum* mengalami 2 fase meliputi fase logaritmik dan fase stasioner. Fase adaptasi tidak terlihat karena pada waktu pengambilan inokum *L. plantarum* adalah pada fase logaritmik, sehingga pertumbuhan bakteri berjalan sangat cepat. Fase logaritmik ditandai dengan peningkatan jumlah sel yang signifikan pada jam ke-0 sampai jam ke-26. Reiny (2012) menyatakan pada fase logaritmik sel membelah diri dengan laju yang konstan, masa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama. Selanjutnya fase stasioner yang ditandai dengan pertumbuhan yang konstan, jumlah bakteri yang hidup dan yang mati sama yaitu pada jam ke-26 sampai jam ke-34. Menurut Reiny (2012) bahwa pada fase stasioner kandungan nutrisi mulai habis sehingga terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi yang menyebabkan beberapa sel mati, selain itu terjadi penumpukan metabolit hasil aktivitas metabolisme sel.

Menurut Djie dan Sartini (2008), umumnya bakteri asam laktat menghasilkan metabolit primer seperti asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin pada fase logaritmik dan fase stasioner. Januarsyah (2007) menyatakan bahwa produksi bakteriosin yang optimal bakteri *Lactobacillus sp.* pada fase stasioner yaitu pada waktu inkubasi 14 jam. Menurut Pramono dkk., (2003) kecepatan pertumbuhan didasarkan pada adanya sumber energi dan nutrisi, serta kondisi lingkungan yang cocok. Yuliana (2007) menambahkan untuk bakteri asam laktat fase logaritmik dicapai pada inkubasi 18-24 jam tergantung media dan jenis BAL. Berdasarkan Gambar 4.1 diketahui bahwa fase stasioner pertumbuhan bakteri *L. plantarum* yaitu pada waktu inkubasi 26 jam. Hal ini menjadi waktu inkubasi yang digunakan dalam produksi bakteriosin.

4.4 Produksi Bakteriosin Menggunakan Variasi pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak serta Aktivitas Hambatnya

Produksi bakteriosin dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH media dan konsentrasi yeast ekstrak terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*. Penelitian ini diawali dengan pembuatan inokulum kerja *L. plantarum*. 2% inokulum *L. plantarum* dimasukkan dalam 25 mL media MRSB yang sudah ditambahkan dengan nutrisi yeast ekstrak sebagai penyusun komponen-komponen sel bakteri. Han (2011) mendapatkan aktivitas hambat bakteriosin mencapai 220 mm² dari *Lactobacillus plantarum* YJG dengan penambahan nutrisi yeast ekstrak. pH media dikondisikan dengan menggunakan HCl 1N dan NaOH 1N untuk mendapatkan pH optimum produksi bakteriosin. Proses produksi bakteriosin dilakukan selama 26 jam (sesuai dengan hasil kurva pertumbuhan *L. plantarum* yang menunjukkan fase stasioner) dan diinkubasi pada

suhu 37°C yang merupakan temperatur optimum bagi spesies *Lactobacillus* dalam memproduksi bakteriosin. Ekstrak kasar bakteriosin dipisahkan dari suspensi bakteri hasil produksi menggunakan sentrifugasi dingin agar bakteriosin tidak mengalami denaturasi protein. Supernatan hasil sentrifugasi di saring dan diukur nilai pH nya.

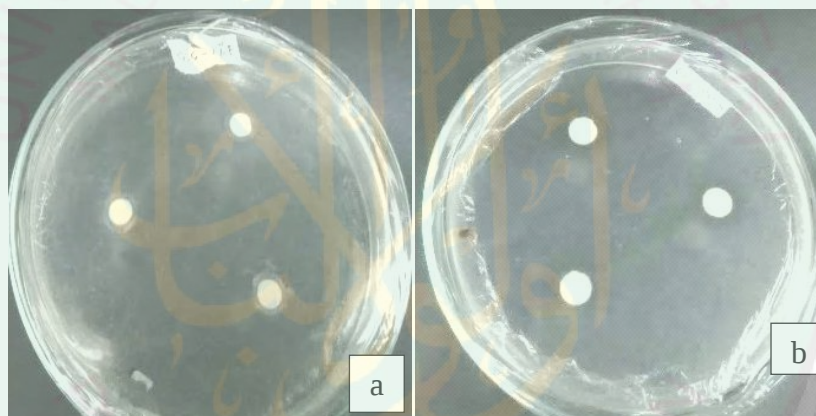
Supernatan bakteriosin mengalami penurunan nilai pH, masing-masing berada pada kondisi asam. Seperti yang dijelaskan oleh Syahniar (2009) bahwa, kondisi asam tersebut disebabkan oleh adanya asam-asam organik yang terbentuk sebagai metabolit primer dari bakteri asam laktat. Asam-asam organik yang terdapat di dalam supernatan antimikroba tersebut dapat menutupi aktivitas bakteriosin yang terbentuk dalam menghambat bakteri uji sehingga perlu dilakukan penetralan supernatan menggunakan NaOH 1 N (Soumya, dkk., 2012). Berikut reaksi yang terjadi:



Penetralan asam laktat dengan natrium hidroksida menghasilkan garam natrium laktat dan air. Penetralan pH supernatan bebas sel dilakukan sampai pH 6,2. Sesuai dengan pernyataan Hatta dkk., (2010) bahwa pH yang optimal untuk aktivitas penghambatan bakteriosin berkisar antara 5,8-6,2 dimana bakteriosin mampu melakukan penghambatan terhadap bakteri patogen sebesar 90-100%. Supernatan netral bakteriosin siap digunakan sebagai senyawa antibakteri.

Aktivitas antibakteri bakteriosin menunjukkan besarnya aktivitas yang dihasilkan oleh bakteriosin dari *L. plantarum* dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Gonzales dkk., (1996) menyatakan bahwa proses

kontak langsung antara molekul bakteriosin dengan membran sel mampu mengganggu potensial membran berupa ketidakstabilan membran sitoplasma. Ketidak stabilan tersebut mengakibatkan pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui gangguan terhadap gaya gerak proton. Lubang tersebut menyebabkan terjadinya perubahan gradien potensial membran dan pelepasan molekul intraseluler ataupun masuknya substansi ekstraseluler sehingga pertumbuhan sel menjadi terhambat dan menghasilkan proses kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin.



Gambar 4.2. Aktivitas penghambatan bakteriosin terhadap (a) *Escherichia coli* (b) *Staphylococcus aureus*

Hasil uji aktivitas ditunjukkan dengan munculnya zona hambat (zona bening) pada sekitar kertas cakram yang telah direndam senyawa antibakteri bakteriosin. Zona hambat yang positif ditunjukkan dengan adanya warna bening maupun warna semu dan akan negatif apabila tidak terdapat warna bening maupun warna semu disekitar sumur. Menurut Pan (2009), aktivitas antibakteri dikatakan lemah apabila memiliki diameter zona hambat 0-3 mm, sedang 3-6 mm

dan kuat > 6 mm. Berdasarkan Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji Gram positif dan Gram negatif yaitu *S. aureus* dan *E. coli*. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Karpinski dan Szkaradkiewicz (2013) bahwa bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri gram positif dan Gram negatif.

Tabel 4.1. Aktivitas antibakteri Bakteriosin dalam Menghambat Pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*

Nilai pH	Konsentrasi yeast ekstrak (%)	Zona hambat <i>E. coli</i> (mm)	Zona hambat <i>S. aureus</i> (mm)
5,5	0,5	3,19	2,73
	1	3,92	2,05
	1,5	2,92	1,67
6,0	0,5	3,38	4,03
	1	3,43	3,18
	1,5	2,44	2,89
6,5	0,5	2,85	2,24
	1	3,10	2,74
	1,5	2,13	2,19

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan bahwa bakteriosin memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan luas hambatan paling tinggi 3,92 mm dan terhadap *S. aureus* paling tinggi 4,03 mm. *S. aureus* memiliki aktivitas hambat lebih besar dari *E. coli*. Hal ini sesuai dengan Suwayvia (2017) yang melakukan uji aktivitas bakteriosin dari *L. plantarum* FNCC 0020 mendapatkan aktivitas hambat lebih besar pada *S. aureus* yaitu 9,57 mm sedangkan *E. coli* 6,32 mm. Ali (2011) mendapatkan aktivitas hambat bakteriosin asal *L. plantarum* VGW8 luas zona hambat lebih besar pada *S. aureus* yakni 17 mm sedangkan untuk *E. coli* 13 mm. Faiza (2015) mendapatkan aktivitas hambat bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* lebih besar pada *S. aureus* yakni 2,46 mm sedangkan untuk

E. coli 2,27 mm. Rajaram (2010) mendapatkan aktivitas bakteriosin dari *Lactobacillus lactis* lebih besar pada *S. aureus* yakni 25 mm sedangkan untuk *E. coli* 12 mm. Hendriani dkk., (2009) mendapatkan aktivitas hambat bakteriosin dari sampel yogurt lebih besar pada *S. aureus* yakni 35,45 mm sedangkan untuk *E. coli* 11,60 mm.

Bakteriosin memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dibandingkan dengan *E. coli*. Hal ini dikarenakan struktur penyusun dinding sel bakteri gram positif dan negatif berbeda. Bakteri gram positif seperti *S. aureus* memiliki senyawa khusus berupa asam tekoat sebanyak 50% dari berat kering dinding sel. Asam tekoat berfungsi dalam menjaga transportasi ion, integritas dinding sel, penggantian choline oleh ethanol amine sehingga resisten terhadap autolisis serta menjaga permeabilitas eksternal (Brooks dkk., 2005). Sehingga bakteriosin lebih mudah dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif jika dibanding dengan bakteri gram negatif. Sedangkan bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks dan berlapis serta tidak mengandung asam tekoat sebagai salah satu reseptor bakteriosin sehingga lebih resisten. Selain itu, adanya membran luar yang membentuk lapisan terluar dari selubung sel yang berfungsi sebagai penghalang efisien melawan larutan hidrofobik tertentu seperti bakteriosin (Olasupo, 2003). Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Ray (2004) bahwa bakteriosin asal BAL tidak efisien dalam menghambat bakteri gram negatif karena membran terluarnya bersifat hidrofilik dan dapat menghalangi aksi bakteriosin.

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan luas zona hambat tertinggi yaitu 3,92 mm pada

variasi pH 5,5 konsentrasi yeast ekstrak 1%, sedangkan terendah yaitu 2,13 mm pada variasi pH 6,5 konsentrasi yeast ekstrak 1,5%. Sedangkan *S. aureus* dengan luas zona hambat tertinggi 4,03 mm pada variasi pH 6,0 konsentrasi yeast ekstrak 0,5% sedangkan terendah 1,67 mm pada variasi pH 5,5 konsentrasi yeast ekstrak 1,5%. Hal ini sesuai dengan penelitian Kusmarwati (2014) yang melakukan produksi bakteriosin pada kondisi pH 6,0 dengan penambahan yeast ekstrak 0,5% menghasilkan aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* dengan luas zona hambat 5 mm. Ravi (2012) juga mendapatkan aktivitas bakteriosin yang diproduksi oleh *L. plantarum* isolasi dari susu sapi mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* tertinggi pada pH 6,0 dengan luas zona hambat mencapai 21 mm. Suwayvia (2017) mendapatkan aktivitas bakteriosin dari *L. plantarum* FNCC 0020 pada perlakuan pH 6,0 luas zona hambat *S. aureus* mencapai 4,33 mm dan *E. coli* mencapai 4,11 mm. Barbosa (2016) mendapatkan aktivitas bakteriosin asal *L. plantarum* MBSa4 pada pH produksi 6,0-6,5 mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan luas zona hambat 7 mm sedangkan untuk *E. coli* tidak ada aktifitas.

Sivakumar (2010) mendapatkan aktivitas hambat bakteriosin dari *Lactobacillus acidophylus* terhadap *S. aureus* dan *E. coli* mencapai 10 mm-13mm pada penambahan yeast ekstrak 1%. Prabhu dkk., (2011) melakukan produksi bakteriosin isolasi dari buah Mangga dengan penambahan sumber nitrogen berupa tripton, yeast ekstrak dan pepton, mendapatkan aktivitas hambat tertinggi pada penambahan yeast ekstrak dengan luas zona hambat pada *S. aureus* mencapai 9 mm dan *E. coli* mencapai 7,5 mm. Yeast ekstrak memberikan efek stimulasi terhadap pertumbuhan sel mikroba karena merupakan komponen larut

air dari sel ragi yang terdiri dari asam amino, peptida, karbohidrat dan garam. Asam amino atau peptide dalam yeast ekstrak dapat bertindak sebagai prekursor untuk sintesis bakteriosin (Pandey, 2016).

Berdasarkan hasil analisis ragam two way annova didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya tidak ada interaksi antara pH dan yeast ekstrak yang signifikan terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin. Analisis Tukey HSD juga menunjukkan hasil aktivitas antibakteri bakteriosin tidak berbeda nyata pada masing-masing perlakuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa uji lanjut berupa purifikasi bakteriosin dapat dilakukan pada semua perlakuan, sehingga dipilih perlakuan pH 6,0 dengan penambahan yeast ekstrak 1% yang dianggap memiliki aktivitas cukup baik dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*.

4.5 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat dan Dialisis

Purifikasi dilakukan untuk meningkatkan aktivitas antibakteri bakteriosin. Dalam penelitian ini purifikasi menggunakan garam amonium sulfat karena memiliki daya larut yang tinggi dan tidak toksik terhadap kebanyakan enzim, selain itu dapat meningkatkan stabilitas enzim tanpa mempengaruhi struktur proteinnya. Penambahan garam amonium sulfat dengan konsentrasi tinggi yaitu 60% menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan hidrofobik protein akan berikatan dengan garam. Ion-ion garam terhidrasi lebih besar dari molekul-molekul protein. Semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam menyebabkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan mengendap (salting out). Penambahan garam terkonsentrasi juga menyebabkan perubahan struktur tersier atau kuartener protein tanpa adanya pemecahan ikatan kovalen, lapisan molekul bagian dalam yang bersifat hidrofobik akan terlipat ke

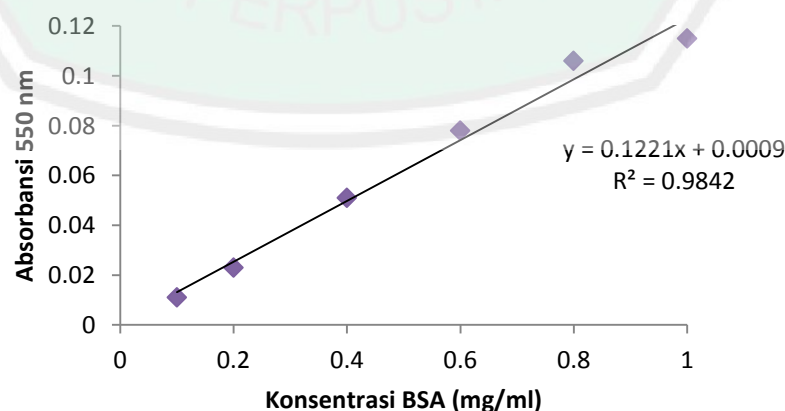
dalam sehingga protein akan menggumpal/mengendap. Proses purifikasi dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah denaturasi protein dan didiamkan selama 24 jam agar proses pengendapan protein bakteriosin maksimal. Endapan protein bakteriosin hasil purifikasi dalam penelitian ini menunjukkan jenis protein yang hidrofobik karena posisi endapan protein yang menempel pada dinding tabung sentrifuge. Hal ini juga didukung oleh Amer (2007) yang menyatakan bahwa *L. plantarum* menghasilkan bakteriosin yang disebut dengan plantarisin, termasuk peptida-peptida kationik dan mempunyai sifat hidrofobik. Inaktivasi mikroorganisme oleh bakteriosin tergantung pada interaksi hidrofobik antara sel-sel bakteri dengan molekul-molekul bakteriosin, sehingga bagian hidrofobik di dalam molekul bakteriosin merupakan hal yang diperlukan untuk aktivitasnya dalam menghambat bakteri sensitif. Selanjutnya endapan protein dimurnikan kembali dengan cara dialisis.

Molekul garam amonium sulfat sisa pengendapan serta molekul pengganggu lainnya dapat hilang dengan cara dialisis. Proses dialisis dilakukan dengan menambahkan endapan protein dengan larutan buffer fosfat pH 7 untuk mempertahankan pH netral bakteriosin, selanjutnya dimasukkan dalam kantung selopon (sebagai membran dialisis). Konsentrasi larutan buffer dalam membran dialisis dibuat lebih tinggi dari larutan di luar membran agar molekul-molekul yang berukuran lebih kecil dapat keluar melalui pori-pori membran sedangkan molekul-molekul yang berukuran lebih besar dapat tetap tinggal di dalam membran. Pengadukan menggunakan stirer dapat mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari membran. Amonium sulfat akan keluar dari membran dialisis sedangkan bakteriosin tetap di dalam membran. Hal ini dapat

4.6 Kadar Protein Bakteriosin dan Aktivitas Antibakteri Bakteriosin

$$\begin{array}{ccc} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 2\text{NaOH} & \xrightarrow{\quad} & \text{Cu(OH)}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 5\text{H}_2\text{O} \\ \text{Cu(OH)}_2 & \xrightleftharpoons{\quad} & \text{Cu}^{2+} + 2\text{OH}^- \end{array}$$


Menurut Carprette (2005) Protein dapat ditetapkan kadarnya secara kualitatif dengan metode biuret dengan prinsip bahwa, ikatan peptida dapat membentuk senyawa kompleks berwarna ungu dengan penambahan garam kupri dalam suasana basa. Identifikasi dilakukan dengan mengambil supernatan bakteriosin sebelum dan sesudah purifikasi, ditambahkan dengan pereaksi biuretyang terdiri dari natrium hidroksida (NaOH 10%) dan tembaga sulfat (CuSO_4 0,1%). Suasana basa dihasilkan dari penambahan NaOH sedangkan CuSO_4 berfungsi untuk menghasilkan warna biru keunguan. Perubahan warna menjadi ungu ini, menandakan bahwa dalam larutan tersebut telah terbentuk senyawa kompleks. Senyawa ini terbentuk antara Cu^{2+} dengan gugus C=O dan N-H dari rantai peptida. Reaksi ini disebut reaksi biuret / kondensasi 2 molekul urea (Erlindawati, dkk., 2015). Reaksi positif (Harrow, 1954 dalam Goretti, 2014) berwarna ungu untuk dua atau lebih ikatan peptida. Menurut Suparjo (2008) bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* termasuk bakteriosin kelas II yang tahan panas dan mengandung 2 peptida.



Gambar 4.4 Kurva Standar BSA

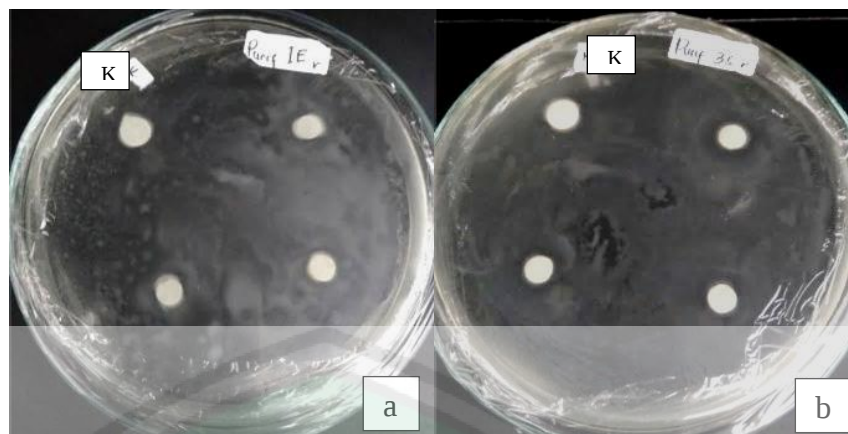
Tahap pengukuran konsentrasi protein dengan cara membuat kurva standar protein menggunakan larutan Bovin Serum Albumin (BSA) yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dan absorbansinya. Pengukuran dilakukan menggunakan panjang gelombang 550nm. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi protein dan dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri bakteriosin. Hasil pengukuran konsentrasi protein serta aktivitas antibakteri bakteriosin dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Konsentrasi Protein dan Aktivitas Antibakteri Bakteriosin

Bakteri Uji	Sebelum purifikasi		Setelah purifikasi	
	Z (mm)	Kp (mg/ml)	Z (mm)	Kp (mg/ml)
<i>Eschericia coli</i>	3,43	47,02	3,81	0,44
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,18		5,08	

*Kp: Konsentrasi protein; Z: Zona hambat

Berdasarkan Tabel 4.2, konsentrasi protein bakteriosin sebelum purifikasi sebesar 0,44 mg/ml dan setelah purifikasi meningkat menjadi 47,02 mg/ml. Dapat dilihat bahwa supernatan netral memiliki konsentrasi protein lebih tinggi dari bakteriosin murni karena dimungkinkan masih terdapat yeast ekstrak yang memiliki kandungan protein tinggi. Suwayvia (2017) melaporkan konsentrasi protein sebelum dan sesudah purifikasi yang dihasilkan dari *L. plantarum* FNCC 0020 sebesar 1,06 mg/ml menurun menjadi 0,35 mg/ml. Qing (2014) juga melaporkan protein asal *L. plantarum* ZJ5 sebesar 2,82 mg/ml menurun menjadi 2,52 mg/ml. Hal ini seperti yang diutarakan oleh Bariyah (2012) bahwa konsentrasi protein bakteriosin sebelum purifikasi tidak hanya berasal dari bakteriosin namun ada penghasil protein lain yaitu masih adanya pengaruh dari media *MRSB* yang memiliki kandungan pepton dan yeast ekstrak yang tinggi.



Gambar 4.3 Aktivitas Penghambatan Bakteriosin Setelah Purifikasi terhadap (a) *Eschericia coli* (b) *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat dilihat bahwa, bakteriosin setelah proses purifikasi memiliki aktivitas hambat terhadap bakteri patogen gram positif dan gram negatif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Rheid (1986) dalam Suwayvia (2017) bahwa bakteriosin yang dihasilkan dari tahap pemurnian dialisis merupakan senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri patogen. Tabel 4.4 juga menunjukkan bahwa luas zona hambat yang muncul setelah purifikasi lebih besar dari bakteriosin yang belum di purifikasi. aktivitas bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* meningkat dari 3,43 mm menjadi 3,81 mm pada *S. aureus* meningkat dari 3,18 mm menjadi 5,08. Marie (2012) melakukan purifikasi bakteriosin asal *L. plantarum* LP6SH menggunakan amonium sulfat 60% mendapatkan peningkatan zona hambat pada *E. coli* dari 7 mm menjadi 12 mm dan *S. aureus* dari 11 mm menjadi 16 mm. Lin (2017) melakukan purifikasi bakteriosin oleh *L. plantarum* NTU 102 CF mendapatkan peningkatan aktivitas dalam menghambat *S aureus* dari 0,7 mm menjadi 33,5 mm.

4.7 Kajian Keislaman Mengenai Bakteriosin

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik” (Q.S. Al-A’raf: 56)

Dalam Tafsir Jalalain ayat ini menerangkan bahwa Allah swt. melarang membuat kerusakan di muka bumi. Larangan membuat kerusakan ini mencakup semua bidang, merusak pergaulan, merusak jasmani dan rohani orang lain, merusak penghidupan dan sumber-sumber penghidupan. Padahal bumi tempat hidup ini sudah dijadikan Allah cukup baik. Mempunyai gunung-gunung, lembah-lembah, sungai-sungai, lautan, daratan dan lain-lain yang semuanya itu dijadikan Allah untuk manusia agar dapat diolah dan dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya, jangan sampai dirusak dan dibinasakan (Kemenag, 2018). Salahsatu cara memanfaatkan apa yang ada di bumi ini dengan baik adalah dengan memproduksi senyawa antibakteri bakteriosin. Senyawa ini dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*.

Menurut Tafsir Al-Misbah (Shihab, 2010) lafadz Al-Muhsinin bermakna orang yang berbuat baik, yakni orang yang berbuat ihsan terhadap ibadahnya dan ihsan terhadap orang lain ini dapat dilakukan dengan cara menjaga dan melestarikan lingkungan agar tetap seimbang. Salah satu contohnya yaitu dengan memanfaatkan protein bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Lactobacillus plantarum* sebagai senyawa antibakteri (pengawet) yang aman digunakan pada bahan pangan.

Produksi bakteriosin akan meningkat dengan meningkatnya kondisi pH sampai pH optimum dan kemudian akan mengalami penurunan (Jaya, 2004). Selain itu jumlah nutrisi yang ada pada media pertumbuhan awal potensial untuk membentuk biomassa akhir. Penambahan nutrisi bakteri akan meningkatkan pertumbuhan bakteri *L. plantarum* sehingga meningkatkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan. Yeast ekstrak merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan bakteri. Yeast ekstrak adalah sumber nitrogen yang mengandung berbagai asam amino yang berbeda yang penting dalam meningkatkan produksi plantaricin (Wala'a, 2011).

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ
وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: "Yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya, dan Dia menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya." (Q.S Al-Furqaan: 2)

Asy-Syuyuti dan Jalaludin (1505) dalam kitab tafsir Jalalain menyatakan bahwa yang dimaksud Dia menetapkan suatu ukuran dan member petunjuk kepada semua makhluk kepada ketetapan tersebut. Menurut Qamaruddin (1975) ayat tersebut melukiskan keteraturan penciptaan segala sesuatu yang ditentukan yang berupa ukuran.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. pH yang optimum dan penambahan yeast ekstrak pada produksi bakteriosin mempengaruhi aktivitas hambatnya terhadap bakteri patogen. Penghambatan terbesar terhadap *S. aureus* mencapai 4,03 mm pada perlakuan pH 6,0 dan yeast ekstrak 0,5%. Sedangkan *E. coli* mencapai 3,92 mm pada perlakuan pH 5,5 dan yeast ekstrak 1%.
2. Purifikasi protein bakteriosin dapat meningkatkan aktivitas hambat bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Luas zona hambat *S. aureus* dari 3,43 mm menjadi 5,08 mm sedangkan *E. coli* dari 3,43 mm menjadi 3,81 mm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan faktor penambahan yeast ekstrak dengan variasi konsentrasi yang lebih tinggi untuk memaksimalkan pertumbuhan *L. plantarum* sehingga menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas hambat yang lebih tinggi, serta perlu dilakukan purifikasi dengan metode lain seperti Kromatografi ion exchange untuk memurnikan bakteriosin dan uji lanjut berupa elektroforesis SDS-page untuk mengetahui berat molekul bakteriosin yang dihasilkan

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelbasset M and Kirane Djamila., 2008. *Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb"*. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (16), pp. 2908-2914.
- Abubakar, Arpah. 2015. *Pengaruh pH dan Suhu Pada Produksi Bakteriosin Dari Bakteri Asam Laktat Galur M6-15*. Program Studi Kimia. Fmipa: Ipb.
- Ali, W. Sh. 2011. *Production, purification and characterization of plantaricin from local strains of Lactobacillus plantarum"* Ph.D. thesis, University of Baghdad, College of Science.
- Amezquita, A. and M. M. Brashears. 2002. *Competitive Inhibition Of Listeria Monocytogenes in Ready-To-Eat Meat Products By Lactic Acid Bacteria*. Food Protection Journal 65 (2): 316-325.
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. 2006. *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds*. Food Control 17:454-461.
- Ashraf, R. dan Shah, N. P. 2011. *Antibiotic Resistance Of Probiotic Organisms And Safety Of Probiotic Dairy Products*. Inter. Food Res., 18(3), 837–853.
- Avilgenius. 2015. *Purifikasi Protein Dengan Ammonium Sulfat*. Biokimia: Artikel Harian Sains.
- Bariyah, Khairul. 2012. *Aktivitas antimikroba Bakteriosin asal Lactobacillus Plantarum terhadap berbagai bakteri patogen selama penyimpanan suhu dingin*. Bogor: IPB. Skripsi.
- Barbosa. M. S., S. D. Todorov I. V. Ivanova, Y. Belguesmia, Y. Choise H. Rabesona, J. M. Chobert, T. Haertl B. D. G. M. Franco. 2016. *Characterization of a two-peptide plantaricin produced by Lactobacillus plantarum MBSa4 Brazilian salami*. journal homepage: elsevier.
- Dar Al Kotob Al Ilmiyah. 2007. *Tafsir Al Qur'anul Adzim*. Imam Ibnu Katsir. Beirut-Lebanon.
- D Elgado, A., D. Brito, P. F Ereiro, C. P Eres and J. F. M Arques. 2001. *Antimicrobial activity of L. Plantarum isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives*. EDP Sciences 81: 203–215.
- De Martinis, E. C. P. M. R. P. Publio, p. R. Santarosa and F. Z. Freitas. 2001. *Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products*. Braz. J. Microbiol. 32:32-37.

- De Vuyst, L. And E. Vandamme. 1994. *Antimicrobial Potential Of Lactic Acid Bacteria. Bacteriocin Of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics, And Applications*. De Vuyst L. And E. Vandamme (Eds). Blackie Academic And Professional, London, Pp. 91-142.
- De Vuyst, L. And F. Leroy. 2007. *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications*. Molecular Microbiol and Biotechnol. 13:194–199.
- Drider d, Fimland G, Hechard, Y, McMullen L, Prevost, H. 2006. *The Continuing Story of Class I Bacteriocins*. Microbiol Mol Biol R, 70 (2) 564-582.
- Erlindawati, Puji Ardiningsih Afghani Jayuska. 2015. *Identifikasi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Dari Tiga Isolat Bakteri Tanah Gambut Kalimantan Barat*. Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura. JKK, Tahun 2015, Volume 4(1), halaman 12-16.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Franz, C. M. A. P., M. Du Tolt, N. A. Olasupo, U. Schillinger dan W. H. Holzapfel. 1998. *Plantaricin D, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum BFE 905 from ready-to-eat-salad*. Int. J. Food Microbiol. 26: 231-235.
- Gautam, N. dan Sharma, N. 2009. *Bacteriocin: Safest Approach To Preserve Food Products*. Indian J. Microbiol., 49(3), 204–211. H.Y. Tsen, C.K. Lin, W.R. Chi, J. Applied Microbiol. 85.
- Gonzales, B., P. Arca, B. Mayo and J. Suarez, 1994. *Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin*. Appl. Environ. Microbiol., 6: 2158-2163.
- Goretti, Marie. 2014. *Perbandingan analisa kadar protein terlarut dengan berbagai metode spektroskopi UV-Visible*. Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.
- Hafsan. 2014. *Bakteriosin Asal Bakteri Asam Laktat Sebagai Biopreservatif Pangan*. Ural Teknosains, Volume 8 Nomor 2, Juli 2014, Hlm. 175–184.
- Harrow. 1954. *Textbook Of Biochemistry 6th Edition*. U.S.A: Saunders Company.
- Hatta, T., Tanaka, R., dan Ohmomo, A. 2010. *Isolation And Characterization Of Plantaricin Asm1: A New Bacteriocin Produced By Lactobacillus Plantarum A-1*. International Journal Of Food Microbiology. 137: 94– 99.
- Januarsyah, T. 2007. *Kajian Aktivitas Hambat Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur SCG 1223*. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor. Skripsi.

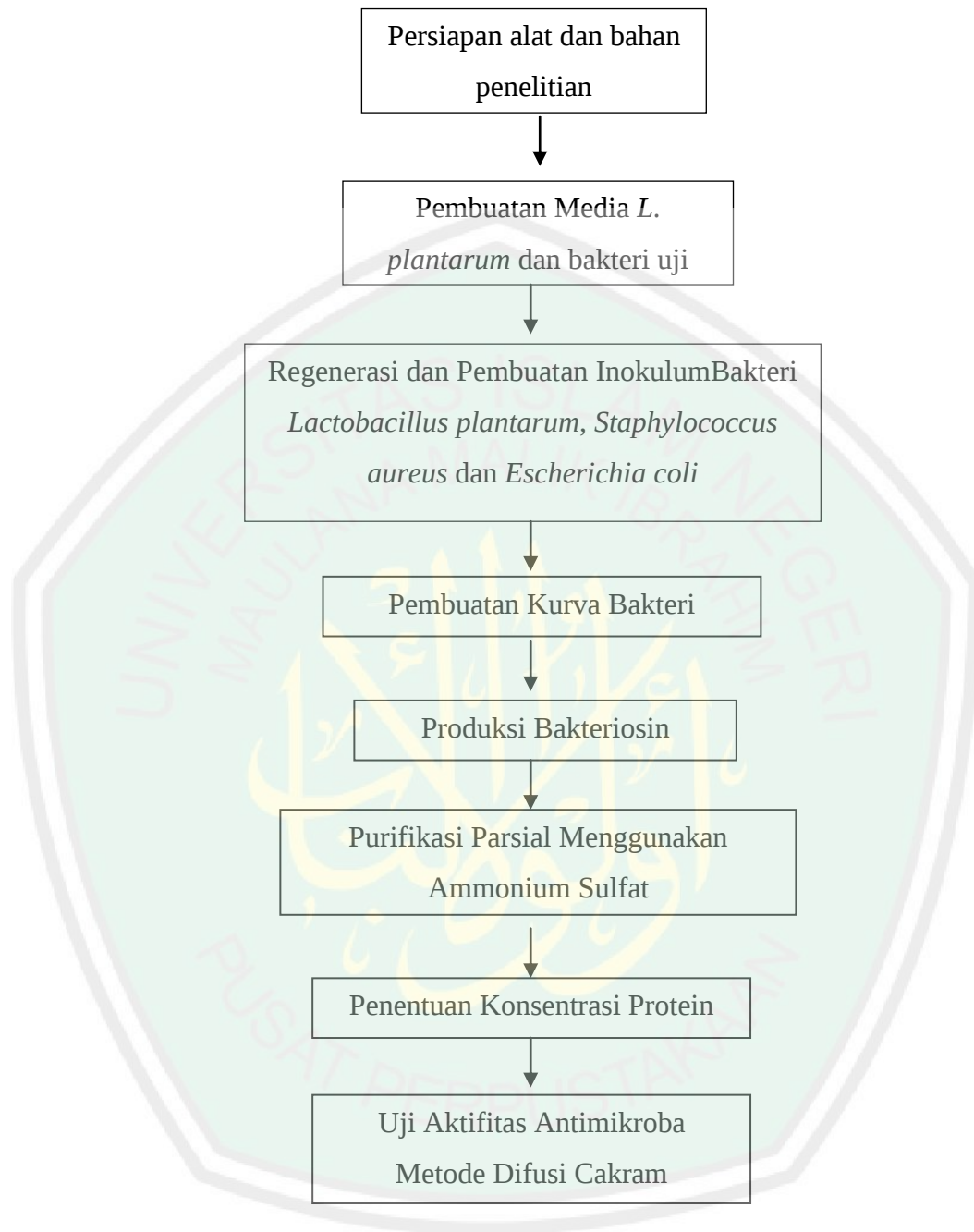
- Jaya, F.P. 2004. *Pengaruh pH dan Suhu pada Produksi Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur M6-15*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. Skripsi.
- Jenie, S.L., dan Shinta E. Rini. 1995. Aktivitas Antimikroba dari Beberapa Spesies.
- Khoiriyah. H dan Puji Ardiningsi. 2014. *Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin Lactobacillus sp. RED4*. JKK, tahun 2014, volume 3 (4), halaman 52-56. ISSN 2303-1077.
- Klaenhammer, T.R. 1993. *Genetics Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria*. *Fems Microbiol. Rev.* 12: 39–86. Pmid: 8398217.
- Kusmarwati, Arifah, Fadila Rachman Arief dan Sakinah Haryati. 2014. *Eksplorasi akteriosin dari bakteri asam laktat asal rusip bangka dan kalimantan*. *JPB Perikanan*. 9(1): 29-40.
- Lade, H. S., M.P. Chitanand, G. Gyananath and T.A. Kadam. 2006. *Studies on some properties of bacteriocins produced by Lactobacillus species isolated from agro-based waste*. *The Internet J. Microbiol.* 2(1):1937-8289.
- Leroy, F., L. de Vuyst, 2001. *Growth of the Bacteriocin-Producing Lactobacillus sakei Strain CTC 494 in MRS Broth Is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4407-4413.
- LinT.H. dan Tzu-Ming Pan. 2017. *Characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus plantarum NTU 102*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* xx, 1-9.
- Marshall, S.H., 2003. *Antimicrobial Peptides: As Natural Alternative to Chemical Antibiotics And a Potential for Applied Biotechnology*. *Electron. J. Biotech.*, 3: 6.
- Marselly, Tri Santi,. 2012. *Produksi Bakteriosin Asal Lactobacillus plantarum sebagai Antimikrob dan Pengujian Ketahanannya terhadap Panas*. Central Library of Bogor Agricultural University.
- Meng, Q., Q. Cai, B.ShiR. Fu, J. Li, X. Chen, K. Qi , M.dan Zhang, 2012. *Optimization of medium composition for production of lacticin LLC518 by Lactococcus lactis subsp. lactis LLC518 using response surface methodology*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 10 : 137-142.
- Nur Hasanah. 2004. *Produksi bakteriosin pada berbagai tingkat aerasi dan uji kestabilan bakteriosin dari bakteri asam laktat galur M6-15*. Skripsi Institut Pertanian, Bogor.

- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude. 2003. *Influence Of Culture Conditions On The Production Of Bacteriocin By Lactobacillus Brevis Og1*. African Journal Of Biotechnology Vol.2(7), 179-184.
- Oonmetta-aree, J., S. Tomoko, G. Piyaman, dan E. Griangsak. 2005. *Antimicrobial properties and action of galangal (Alpinia galanga Linn.) on Staphylococcus aureus*. LWT 39 : 1214-1220.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. 2004. *Antimicrobial Components From Lactic Acid Bacteria*. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, ed. Salminen, S.A., Von Wright, a., ouwehand, A.C. Marcel Dekker, new york: 375-395.
- Pan L, LiC dan Kelly WL. 2009. *Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins*. J Am Chem Soc.;131(12):4327-34.
- Parada. J. L., Carolina Ricoy Caron, Adriane Bianchi P. Medeiros and Carlos Ricardo Soccol. 2007. *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives*. Brazilian Archives of Biology and Technology Vol.50, n. 3 : pp.521-542.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan, 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1*, Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Qing Gu ,Da-Feng Song^{1,2}, Mu-Yuan Zhu². 2014. *Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, aNew Bacteriocin Produced by Lactobacillus plantarumZJ5*. University of Kansas Medical Center.
- Rajaram. G., P. Manivasagan, B. Thilagavathi, A. Saravanakumar. 2010. *Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus lactis. Isolated from Marine Environment*. Advance Journal of Food Science and Technology 2(2): 138-144.
- Ravi S. N., 2V. Deepthi Priyanka, 3P. Srinivas Reddy,1P. Rajanikanth, 1V. Kiran Kumar and 2M. Indira. 2012. *Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by Lactobacillus plantarum Isolated from Cow Milk*. International Journal of Microbiological Research 3 (2): 133-137.
- Rawal, Khusboo, Nirav Bavshar, Gopal Raol, B. V. Raol dan J. D. Patel. 2013. *Bacteriocin: Production and Optimization by lactobacillus species*. Jourbal of Microbiology and Biotechnology Research. 3(6): 64-76.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food microbiology. 3rd edition*. CRC Press Boca Raton, New York, Whasington D. C. London.
- Ray B, Bhunia A. 2008. *Food Biopreservatives Of Microbial Origin*. In: Ray B, Bhunia A, Editors. *Fundamental Food Microbiology*. 4th Ed. New York (Usa): Crc Press, Boca Raton. P. 176-187.

- Reiny, S.S. 2012. *Potensi Lactobacillus acidophilus ATCC 4796 sebagai Biopreservatif pada Rebusan Daging Ikan Tongkol*. Jurnal IJAS. 2 (2): 604-613.
- Rustan, I.R. 2013. *Studi Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Cabai Rawit (Capsicum frutescens L.)*. Universitas Hasanuddin, Makassar. Skripsi.
- Savadogo, A., A. T. Q. Cheik, H. N. B. Imael and S. A. Traore. 2006. *Bacteriocins and lactic acid bacteria a minireview*. Afric. J. Biotechnol. 5 (9): 678-683.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Silaban, L. W. 2009. *Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari kulit buah sentul (Sandoricum koetjae (burm. f.) Merr) terhadap beberapa bakteri secara in vitro*. Universitas Sumatera Utara. Medan. Skripsi.
- Singh, R., Sivasubramani, K., Jayalakshmi, S., 2013. *Isolation And Production Of Bacteriocin By Marine Lactobacillus Fermentum Sbs 001*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2(4), 67–73.
- Sivakumar, N., Rajamani dan Al-Bahry Saif. 2010. *Partial Characterization of Bacteriocins produced by Lactobacillus acidophilus and Pediococcus acidilactici*. Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.5: pp. 1177-1184.
- Soumya, T.V., Reshma J., and Surya J, 2012. *Characterization of Bacteriocin Produced by Lactobacillus sp and Optimization of Cultural Conditions*, International Journal of Scientific and Research Publications, Vol. 2: 1-9.
- Smid, E. J. & L. G. M. Gorris. 2007. *Natural antimicrobial for food preservation*. In: Rahman, M. S. (Editor). Handbook of Food Preservation. 2nd Edition. CRC Press, New York.
- Suwayvia. Nadia. 2017. *Produksi bakteriosin asal Lactobacillus plantarum FNCC 0020 sebagai antimikroba dan stabilitasnya pada variasi suhu pemanasan, suhu penyimpanan dan pH*. Fakultas Sains. UIN Malang. Skripsi.
- Syahniar. T.M. 2009. *Produksi Dan Karakterisasi Bakteriosin Asal Lactobacillus Plantarum 1a5 Serta Aktivitas Antimikrobanya Terhadap Bakteri Patogen*. :IPB. Skripsi.
- Tafsir Quran Al-Aliyy. 2005. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*, Depertemen Agama RI: Diponegoro.

- Thirumurugan, A., Ramachandran, S. and Gobikrishnan, S. (2015). *Optimization of Medium Components for Maximizing the Bacteriocin Production by Lactobacillus Plantarum ATM11 using Statistical Design*. International Food Research Journal. Vol 22 (3) : 1272-1279.
- Todorov, S. D. And L. M. T. Dicks. 2004. *Influence Of Growth Conditions On The Production Of A Bacteriocin By Lactobacillus Lactis Subsp. Lactis St34br, A Strain Isolated From Barley Beer*. J. Basic Microbiol44: 305-316.
- Usmiati ,S dan E. Noor .2009. *Karakter ekstrak bakteriosin dari bakteri asam laktat galur SCG 1223 selama penyimpanan pada berbagai pH dan suhu pemanasan. Pros.Simposium Pascapanen Pertanian 14 Agustus 2009. Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian*. hlm.223 – 230.
- Usmiati S, 2009.*Penggunaan Bakteriosin sebagai Alternatif Pengawetan DagingAyam Kasus Daging Ayam Berformalin*, JITV 14(1) : 145-154.
- Usmiati S. Tri M. 2007. *Seleksi Dan Optimasi Produksi Bakteriosin Dari Lactibacillus Sp. Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Pascapanen Pertanian*. Bogor.
- Utami, D.A. 2011. *Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (Bal) Probiotik Dengan Gen 16s Rrna Yang Berpotensi Menghasilkan Bakteriosin Dari Fermentasi Sirsak (Annona Maricata L.) Di Sumatera Barat*. Tesis. Universitas Andalas, Padang.
- Vignolo GM, de Kairuz MN, de Ruiz Holgado AAP, Oliver G (1995). *Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by Lactobacillus casei CRL 705.. J. Appl. Bacteriol*. 78: 5-1.
- Wala'a Shawkat Ali and Rashid M. Musleh. 2011. *Determination of Optimum Conditions for Plantaricin VGW8 Production by Lactobacillus plantarum VGW8*. Al-Mustansiriyah J. Sci. Vol. 22, No. 4.
- Waluyo, L. 2011. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. UMM Press. Malang.
- Yusuf, M. 2013. *Lactic Acid Bacteria:Bacteriocin Producer: A Mini Review*. IOSR. Journal Of Pharmacy. 3 (4) : 44-50.

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



LAMPIRAN 2 . Skema Kerja

1.1 Pembuatan Media MRSA (*deMann, Rogosa and Sharpe Agar*)

MRSA(*deMann, Rogosa and Sharpe Agar*)

- Ditimbang 6,82 gr
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan dalam keadaan miring

Hasil

1.2 Media MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*)

MRSB (*deMann, Rogosa and Sharpe Broth*)

- Ditimbang 5,6 gr
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades
- Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL
- Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit
- Didinginkan

Hasil

1.3 Media NA(Nutrient Agar)

NA (Nutrient Agar)

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

Hasil

1.4 Media NB(Nutrient Broth)

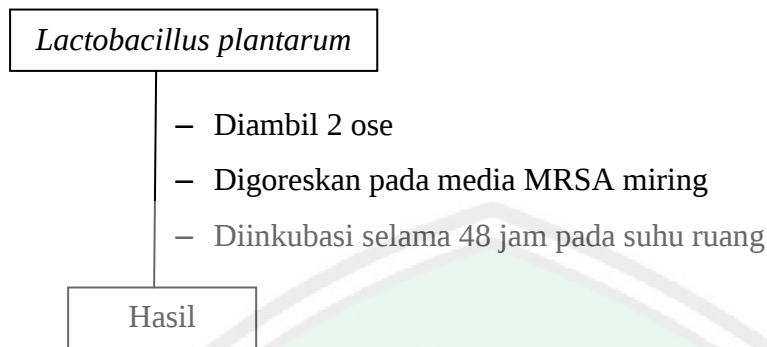
NB (Nutrient Broth)

- Diambil sebanyak 1,8 gram
- Dilarutkan dengan 100 mL aquades hangat
- Dipanaskan sampai mendidih
- Dimasukkan ke dalam 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

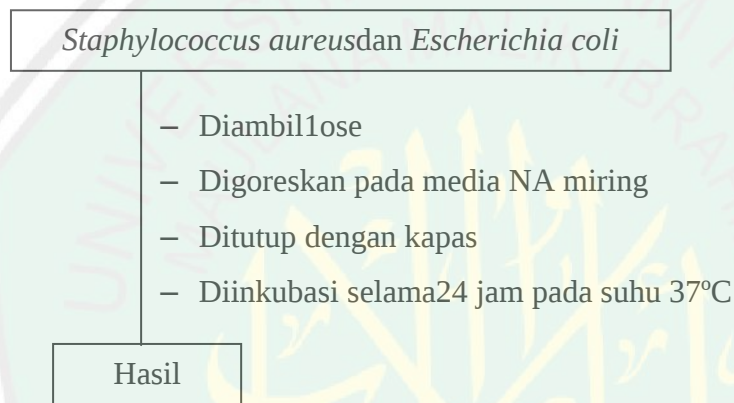
Hasil

1.2 Regenerasi Bakteri

1.2.1 Regenerasi *Lactobacillus plantarum*

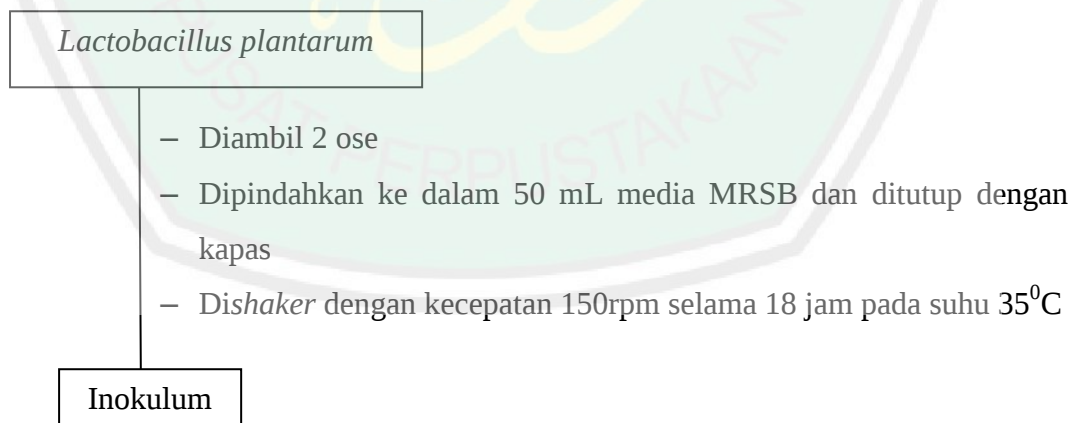


1.2.2 Regenerasi *Lactobacillus plantarum*



1.3 Pembuatan Inokulum

1.3.1 Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum*



1.3.2 Pembuatan Inokulum *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli*

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

Inokulum

1.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

- Diambil sebanyak 2% pada media MRSA
- Diinokulasikan pada 100 mL media MRSB
- Dipipet 2 mL suspensi bakteri
- Diamati *Optical Density* (OD) setiap 4 jam selama 34 jam
- Diukur menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm.

Inokulum

1.5 Perhitungan Jumlah Sel Bakteri

NaCl 0,9% steril

- Dimasukkan ke dalam 10 tabung reaksi dengan volume masing-masing 9 ml
- Ditambahkan inoculum 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

1.6 Produksi Bakteriosin Media MRSB

Isolat *Lactobacillus plantarum*

- Diinokulasi ke dalam 25 mL media MRSB dengan konsentrasi yeast ekstrak 0,5%, 1,0% dan 1,5%
- Dikondisikan pada pH 5,5; 6,0 dan 6,5
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 26 jam
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit
- Dikondisikan pada pH 6,2 menggunakan NaOH 1M
- Dimurnikan menggunakan ammonium sulfat dan dialisis

Hasil

1.7 Purifikasi Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat

Bakteriosin kasar

- Ditambah dengan padatan amonium sulfat 60% sebanyak 36,1 gram
- Diaduk selama 24 jam pada suhu 4°C
- Disentrifugasi dengan kecepatan 10,000 rpm selama 20 menit (4°C)
- Ditambahkan 25 ml buffer kalium fosfat 0,05 M (pH 7.0)
- Didialisis menggunakan kantong selofan
- Didiamkan dalam buffer kalium fosfat 0,2 M sebanyak 500 ml suhu 4°C
- Diukur konsentrasi protein dengan metode biuret

Hasil

1.8 Penentuan Konsentrasi Protein

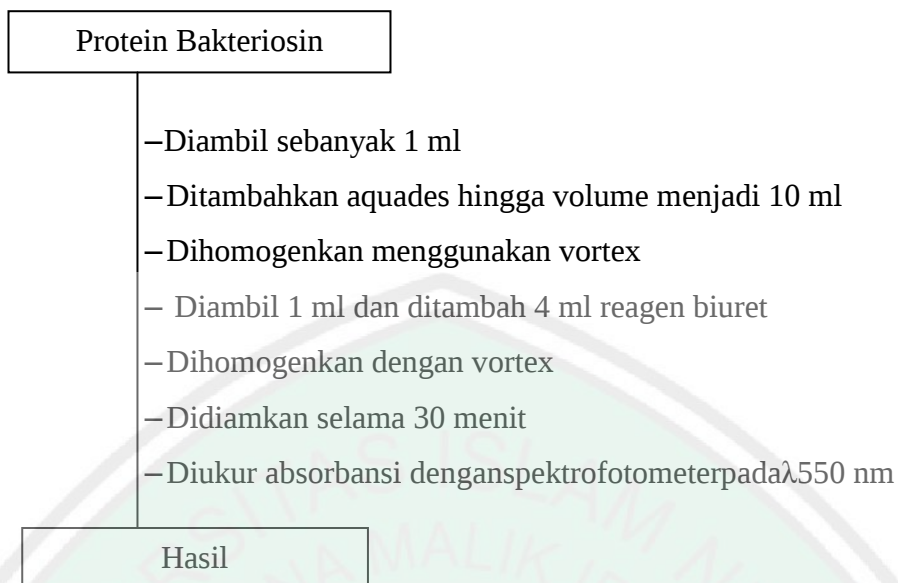
1.8.1 Pembuatan Kurva Standar

Larutan standart BSA

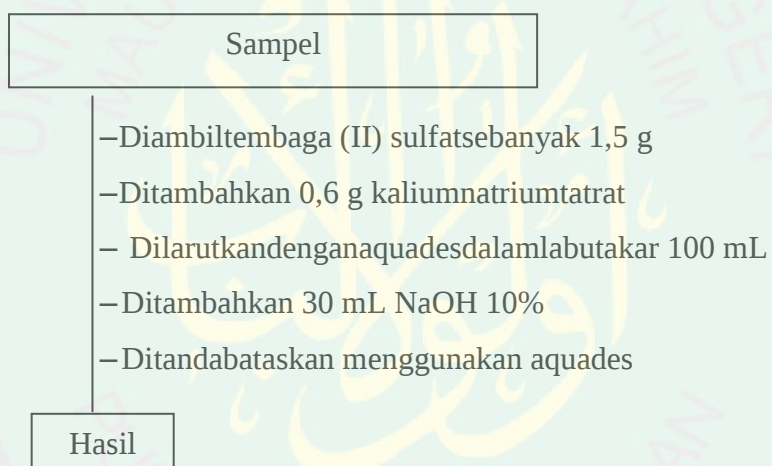
- Dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1mg/mL
- Dipipet masing-masing 1 ml dan ditambah 4 ml reagen biuret
- Dihomogenkan dengan vortex
- Didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit
- Diukurabsorbansi denganspektrofotometerpada λ 550 nm

Hasil

1.8.2 Analisis Konsentrasi Protein Bakteriosin



1.8.3 Pembuatan Pereaksi Biuret



1.9. Uji Aktivitas Antimikroba Metode Difusi cakram

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli*

- Diambil sebanyak 50 μ l
- Dibuat kertas cakram steril dengan diameter 6 mm
- Direndam didalam larutan ekstrak selama 30 menit
- Diambil dan diletakkan kertas cakram yang mengandung ekstrak bakteriosin diatas medium ujia ktivitas antibakteri
- Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C

Zona hambat

Lampiran 3. Perhitungan

L.3.1 Pembuatan Larutan NaOH 1 M

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

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

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

$$1 \text{ M} = \frac{\text{gram}}{40} \times \frac{1}{0,1 \text{ L}}$$

$$4 = \text{gram}$$

L.3.2. Pembuatan NaCl 0,9%

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

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

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

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

L.3.3. Pembuatan Yeast Ekstrak

$$\text{a. } 0,5\%$$

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

$$0,5\% = \frac{\text{berat zat terlarut}}{25 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$0,5 \times 25 = 100 \times \text{berat zat terlarut}$$

$$0,125 \text{ gram} = \text{berat zat terlarut}$$

b. 1%

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

$$1\% = \frac{\text{berat zat terlarut}}{25 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$1 \times 25 = 100 \times \text{berat zat terlarut}$$

$$0,25 \text{ gram} = \text{berat zat terlarut}$$

c. 1,5%

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

$$1,5\% = \frac{\text{berat zat terlarut}}{25 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$1,5 \times 25 = 100 \times \text{berat zat terlarut}$$

$$0,375 \text{ gram} = \text{berat zat terlarut}$$

L.3.4. Pembuatan Amonium Sulfat 60%

$$60\% = 36,1 \text{ gram dalam } 100 \text{ ml}$$

$$= 9,025 \text{ gram dalam } 25 \text{ ml}$$

L.3.5. Pembuatan Buffer Natrium Fosfat 25 ml 0,05 M**a.) Pembuatan stok 1M**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ (1M)}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ (1M)}$
$M = \frac{n \text{ (mol)}}{v \text{ (volume)}}$	$M = \frac{n \text{ (mol)}}{v \text{ (volume)}}$
$1 \text{ M} = \frac{n}{0,025 \text{ L}}$	$1 \text{ M} = \frac{n}{0,025 \text{ L}}$
$n = \frac{\text{massa}}{\text{Mr}}$	$n = \frac{\text{massa}}{\text{Mr}}$
$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{142}$	$0,025 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{120}$
$\text{massa} = 3,55 \text{ gram}$	$\text{massa} = 3 \text{ gram}$

Untuk membuat 1M Na_2HPO_4 dan 1M NaH_2PO_4 masing-masing berat (gram) ditanda bataskan dengan aquades hingga 25 mL
 Untuk membuat larutan buffer fosfat 1M pH 7 diperlukan 14,9 ml NaH_2PO_4 dan dicampur dengan 10,1 mL Na_2HPO_4 sehingga volume total sebanyak 25 mL.

b.) Pengenceran 1M menjadi 0,2 M

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

$$V_1 \times 1M = 50 \text{ mL} \times 0,2M$$

$V_2 = 10 \text{ mL}$ (10 mL buffer kalium fosfat 1M ditandabataskan dengan aquades hingga 50 mL)

c.) Pengenceran 1M menjadi 0,05 M

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

$$V_1 \times 1M = 50 \times 0,05M$$

$V_2 = 2,5 \text{ ml}$ (2,5 mL buffer kalium fosfat 1M ditandabataskan dengan aquades hingga 50 mL)

L.3.6. 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.

L.3.7. Pembuatan NaOH 10%

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

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

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

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

L.3.8. Preparasi kantung selofan

- Kantong selofan dididihkan dalam 5% Na_2CO_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

L.3.9. Pembuatan Larutan Bovin Serum Albumin (BSA) 10 mg/mL

Untuk membuat larutan protein standar 1000 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; 0,8; 1 ppm dalam 10 ml aquades sesuai dengan hasil perhitungan berikut:

- a) Konsentrasi 0,1 mg/mL

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

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

$$V_1 = 1 \text{ ml dalam } 9 \text{ mL aquades}$$

- b) Konsentrasi 0,2 mg/mL

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

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

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

- c) Konsentrasi 0,4 mg/mL

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

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

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

d) Konsentrasi 0,6 mg/mL

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

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

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

e) Konsentrasi 0,8 mg/mL

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

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

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

f) Konsentrasi 1 mg/mL

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

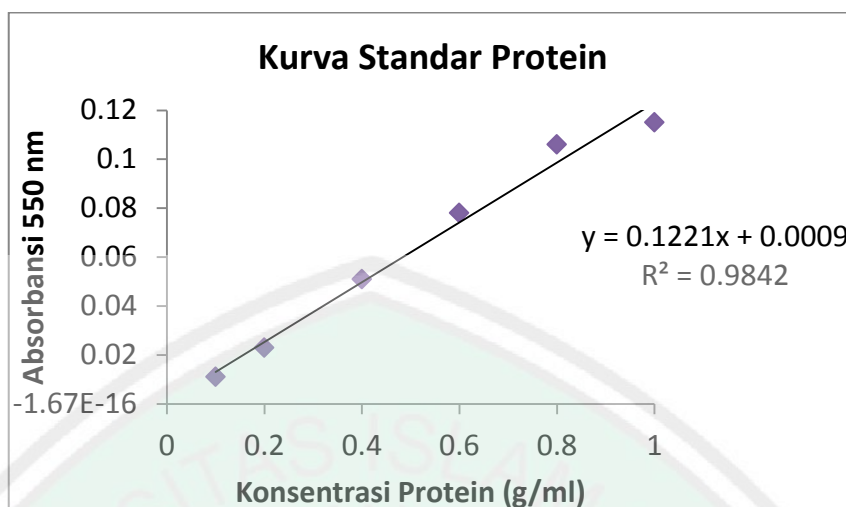
$$V_1 \times 1 = 10 \times 1$$

$$V_1 = 1 \text{ ml dalam } 9 \text{ mL aquades}$$

L.3.9.1 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

L.3.9.2 Kurva Standar Protein



L.3.9.3 Menentukan Konsentrasi Protein Bakteriosin

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

Protein Sebelum Purifikasi

Misal:

$$y = ax + b$$

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

$$0,5870 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,5870 / 0,122 \times 10$$

$$= 48,11 \text{ mg/ml}$$

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

$$0,5603 = 0,122x \times fp$$

$$x = 0,5603 / 0,122 \times 10$$

$$= 45,92 \text{ mg/ml}$$

$$x = (48,11 + 45,92) : 2$$

$$= 47,02 \text{ mg/ml}$$

Protein Setelah Purifikasi

Misal: $y = ax + b$

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

$$0,0094 = 0,122x \times \text{fp}$$

$$x = 0,0094 / 0,122 \times 10$$

$$= 0,77 \text{ mg/ml}$$

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

$$0,0013 = 0,122x \times \text{fp}$$

$$x = 0,0013 / 0,122 \times 10$$

$$= 0,11 \text{ mg/ml}$$

$$x = (0,77 + 0,11) : 2$$

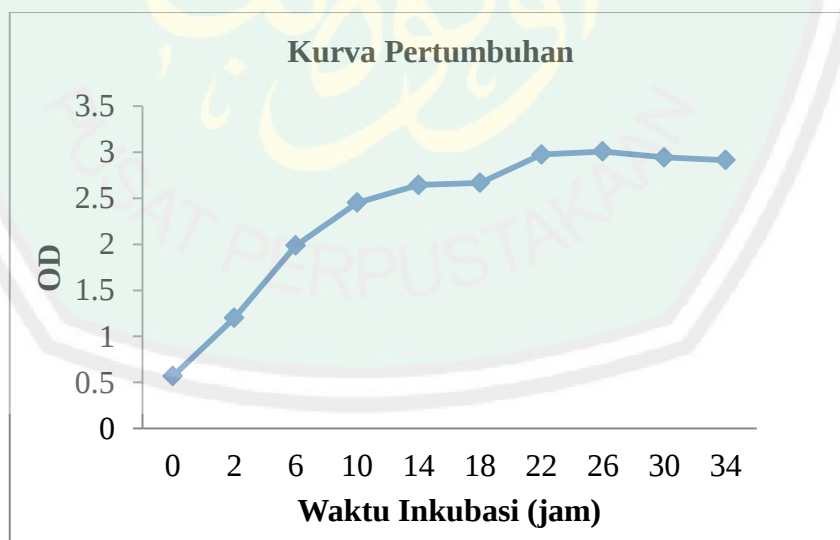
$$= 0,44 \text{ mg/ml}$$

Lampiran 4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027

L.4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi

jam ke-	Nilai OD
0	0.5698
2	1.2005
6	1.9853
10	2.4512
14	2.644
18	2.6676
22	2.975
26	3.0074
30	2.9426
34	2.9136

L.4.2 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027



Lampiran 5. Perhitungan Jumlah Sel Bakteri

Sampel	Absorbansi
A	0,1979
B	0,4273
C	0,6054
D	0,8170
E	0,9982

Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung				
	A	B	C	D	E
10^{-4}	TBUD	SP	SP	SP	SP
10^{-5}	TBUD	TBUD	TBUD	SP	SP
10^{-6}	134,5	238	550,5	TBUD	TBUD
10^{-7}	16	26,5	63,5	95	728
10^{-8}	2	3,5	6	12,5	40,5
10^{-9}	0	1	4,5	1	5
10^{-10}	0	0	0	0	0

Perhitungan jumlah koloni

Absorbansi yang dipilih adalah 0,6054

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah Bakteri} &= \text{Bakteri Hitung} \times 1/\text{fp} \\
 &= 63,5 \times 10^{-7} \text{ cfu}
 \end{aligned}$$

Lampiran 6. Hasil Uji Aktivitas Bakteriosin

L.6.1 Luas Zona Hambat Bakteriosin terhadap *Escheria coli*

Ph	Konsentrasi yeast ekstrak % (b/v)	Zona Hambat Ulangan 1 (mm)	Zona Hambat Ulangan 2 (mm)	Rata-rata (mm)
5,5	0,5	4,18	2,2	3,19
	1	3,71	4,13	3,92
	1,5	3,33	2,5	2,92
6,0	0,5	2,4	4,35	3,38
	1	3,16	3,7	3,43
	1,5	3,41	1,46	2,44
6,5	0,5	3,2	2,5	2,85
	1	4,1	2,1	3,1
	1,5	2,13	2,13	2,13

L.6.2 Luas Zona Hambat Bakteriosin terhadap *Staphylococcus Aureus*

pH	Konsentrasi yeast ekstrak % (b/v)	Zona Hambat Ulangan 1 (mm)	Zona Hambat Ulangan 2 (mm)	Rata-rata (mm)
5,5	0,5	2,96	2,5	2,73
	1	2,9	1,2	2,05
	1,5	2,13	1,2	1,67
6,0	0,5	2,7	5,36	4,03
	1	3,55	2,8	3,18
	1,5	2,55	3,23	2,89
6,5	0,5	2,0	2,48	2,24
	1	3,51	1,96	2,74
	1,5	2,3	2,07	2,19

L.6.3 Perbandingan Luas Zona Hambat Sebelum dan Sesudah Purifikasi

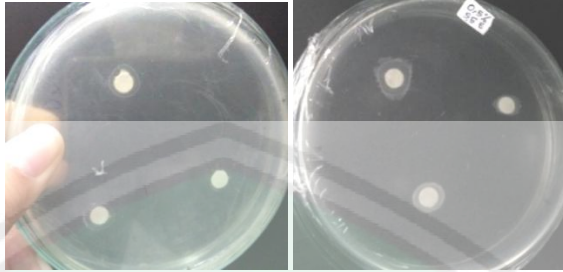
Perlakuan	Bakteri Uji	Sebelum purifikasi	Setelah purifikasi
pH 6,0 yeast ekstrak 1%	<i>Eschericia coli</i>	3,43 mm	3,81 mm
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,18 mm	5,08 mm

L.6.4 Perbandingan Konsentrasi Protein Sebelum dan Sesudah Purifikasi

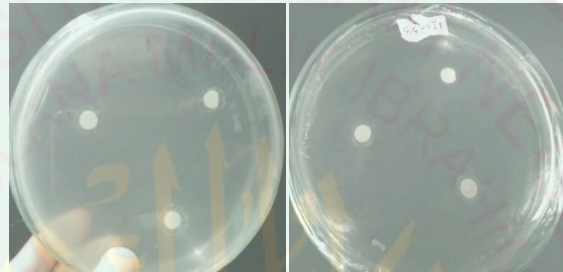
Perlakuan	Bakteri Uji	Sebelum purifikasi	Setelah purifikasi
pH 6,0 yeast ekstrak 1%	<i>Eschericia coli</i>	47,81 mg/ml	0,36 mg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i>		

Lampiran 7. Aktivitas Antibakteri Bakteriosin pada Bakteri Indikator**A. *Eschericia coli***

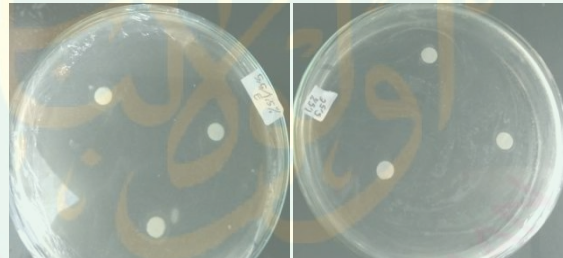
1. 5,5 – 0,5%



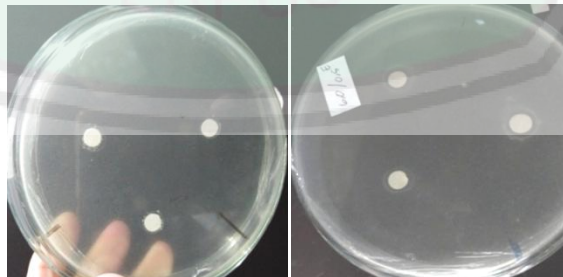
2. 5,5 – 1%



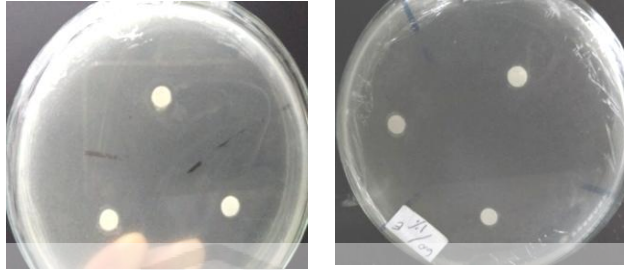
3. 5,5 – 1,5%



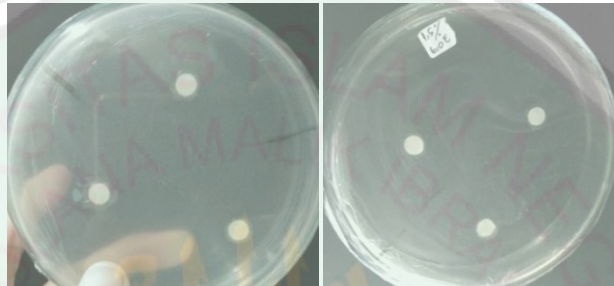
4. 6,0 – 0,5%



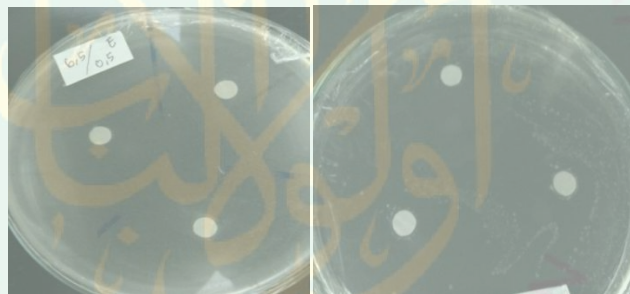
5. 6,0 – 1%



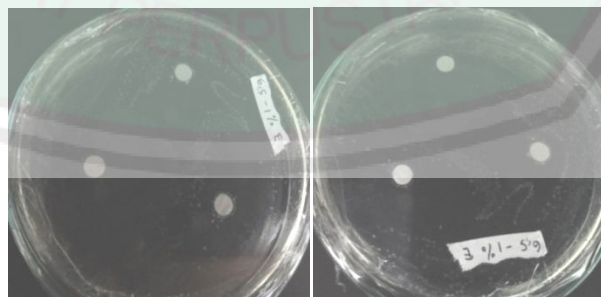
6. 6,0 – 1,5%



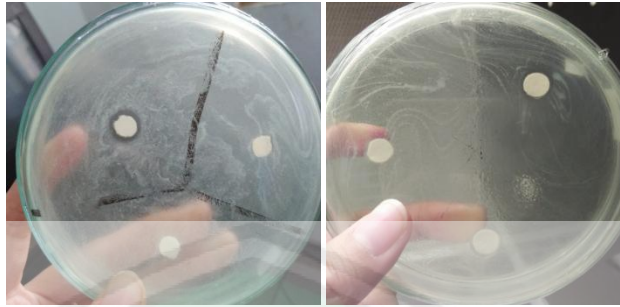
7. 6,5 – 0,5%



8. 6,5 – 1%

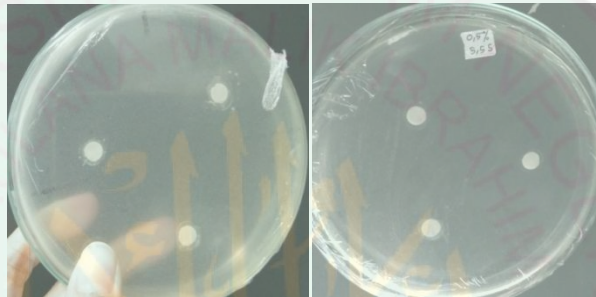


9. 6,5 – 1,5%

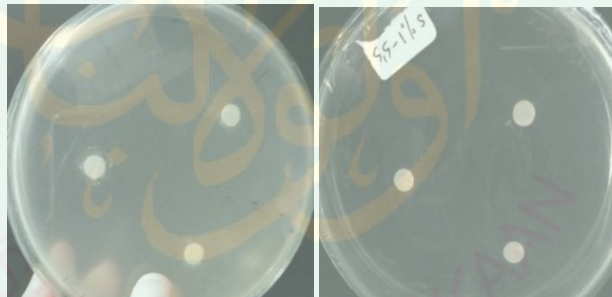


B. *Stapylococcusaureus*

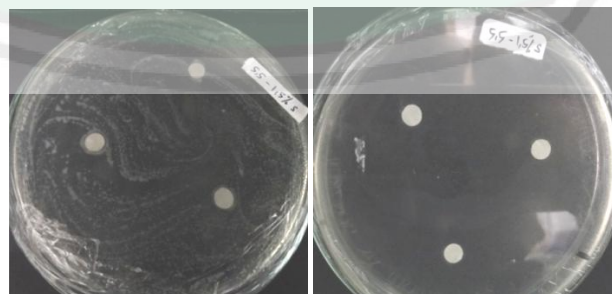
1. 5,5 – 0,5%



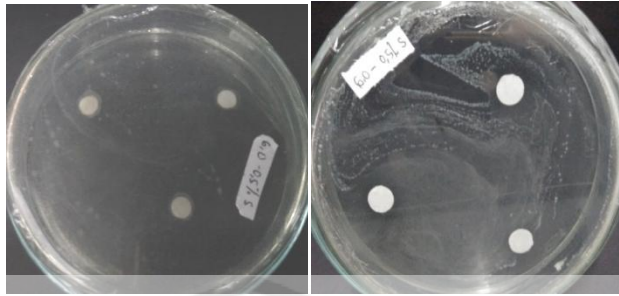
2. 5,5 – 1%



3. 5,5 – 1,5%



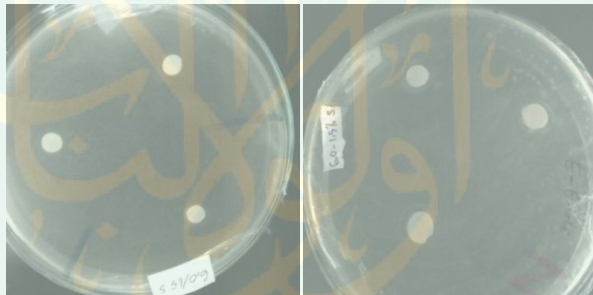
4. 6,0 – 0,5%



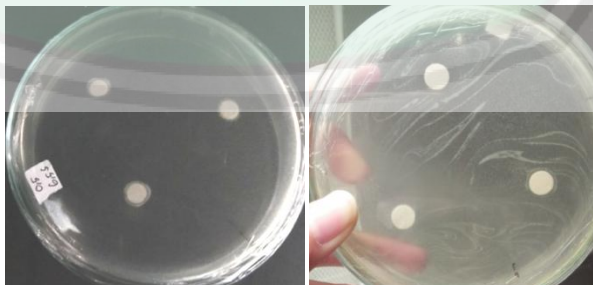
5. 6,0 – 1%



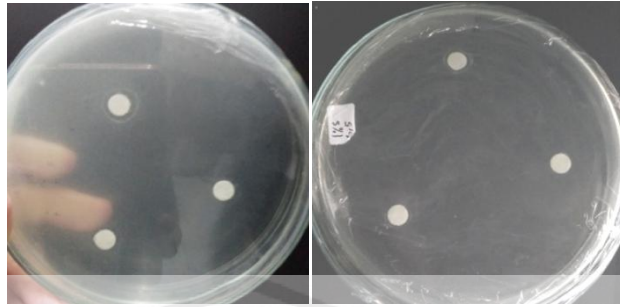
6. 6,0 – 1,5%



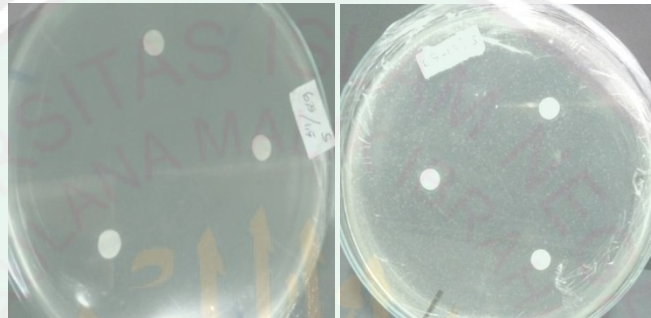
7. 6,5 – 0,5%



8. 6,5 – 1%

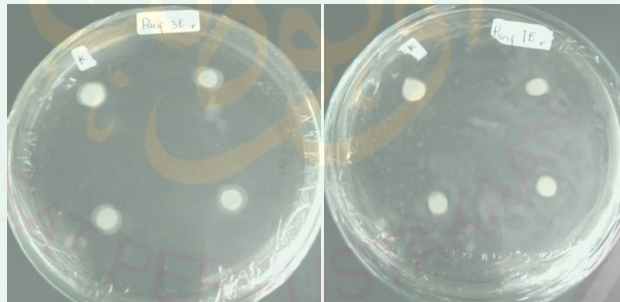


9. 6,5 – 1,5%

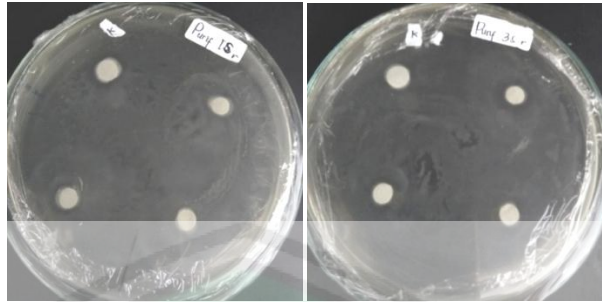


C. Purifikasi (6,0;1%)

1. *Eschericia coli*



2. *Staphylococcus aureus*



Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



Lampiran 9. Hasil Uji Two Way ANNOVA

L.9.1 Univariate Analysis of Variance *Eschericia coli*

Between-Subjects Factors

	N
pH 5.5	6
6.0	6
6.5	6
yeast 0.5	6
1.0	6
1.5	6

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : aktivitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.621 ^a	8	.578	.606	.754
Intercept	166.166	1	166.166	174.176	.000
pH	1.277	2	.638	.669	.536
yeast	3.030	2	1.515	1.588	.257
pH * yeast	.314	4	.079	.082	.986
Error	8.586	9	.954		
Total	179.374	18			
Corrected Total	13.207	17			

Tukey HSD aktivitas

	N	Subset 1
pH 6.5	6	2.6933
6.0	6	3.0800
5.5	6	3.3417
Sig.		.510

Tukey HSD aktivitas

	N	Subset 1
yeast 1.5	6	2.4933
0.5	6	3.1383
1.0	6	3.4833
Sig.		.238

L.9.2 Univariate Analysis of Variance *Staphylococcus aureus*

Between-Subjects Factors

		N
pH	5.5	6
	6.0	6
	6.5	6
yeast	0.5	6
	1.0	6
	1.5	6

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: aktivitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.927 ^a	8	.991	1.209	.389
Intercept	124.820	1	124.820	152.294	.000
pH	4.988	2	2.494	3.043	.098
yeast	1.706	2	.853	1.041	.392
pH * yeast	1.232	4	.308	.376	.820
Error	7.376	9	.820		
Total	140.123	18			
Corrected Total	15.303	17			

Tukey HSD
aktivitas

pH	N	Subset
		1
5.5	6	2.1483
6.5	6	2.3867
6.0	6	3.3650
Sig.		.103

Tukey HSD
aktivitas

yeast	N	Subset
		1
1.5	6	2.2467
1.0	6	2.6533
0.5	6	3.0000
Sig.		.362



KEMENTERIAN AGAMA RI
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-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : RIA ROSIDAH
NIM : 13620038
Judul Skripsi : PENGARUH pH MEDIA DAN KONSENTRASI YEAST EKSTRAK
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERIOSIN OLEH LACTOBACILLUS
PLANTARUM
Pembimbing Utama : ANIK MAUNATIN, S.T. M.P.
Pembimbing Agama : AEYUNUL JANNAH S.Si. MP
Konsultasi :

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan (ditulis tangan)	Tanda tangan (Pembimbing)
1.		BAB I		
2.		BAB I, II		
3.		BAB III		
4.		BAB III		
5.		BAB I, II, III	Acc Prop.	
6.		BAB I		
7.		BAB I, II		
8.		BAB III, IV		
9.		BAB I, II		
10.		BAB I, IV		
11.		BAB I, II, III	Acc prop	
		BAB IV		
			Acc Komp	
			Acc Komp	



Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlaq, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional