

**AKTIVITAS BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT YANG
DIISOLASI DARI LIMBAH CAIR TEMPE DALAM MENGHAMBAT
BAKTERI *Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

Oleh :

**ENDAH ENI
NIM. 18620040**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**AKTIVITAS BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT YANG
DIISOLASI DARI LIMBAH CAIR TEMPE DALAM MENGHAMBAT
BAKTERI *Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

**Oleh :
ENDAH ENI
NIM. 18620040**

**Diajukan kepada :
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**AKTIVITAS BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT YANG
DISOLASI DARI LIMBAH CAIR TEMPE DALAM MENGHAMBAT
BAKTERI *Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

Oleh:
ENDAHI ENI
NM. 18620040

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
pada tanggal 06 Juli 2022

Pembimbing I



Ir. Hj. Liliek Harianic AR., M.P
NIP. 19620901 199803 2 001

Pembimbing II



Dr. H. M. Imamudin, Lc., M.A
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Liska Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

AKTIVITAS BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT YANG
DIISOLASI DARI LIMBAH CAIR TEMPE DALAM MENGHAMBAT
BAKTERI *Bacillus subtilis* DAN *Pseudomonas aeruginosa*

SKRIPSI

Oleh:
ENDAH ENI
NIM. 18620040

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.)
Tanggal: 19 Juli 2022

Penguji Utama : Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19731005 200212 2 003

(.....)

Ketua Penguji : Priya Dewi Fitriyani, M.Sc.
NIP. 19900428 2016080 1 2062

(.....)

Sekretaris Penguji : Ir. Liliek Harianie AR, M.P
NIP. 19620901 199803 2 001

(.....)

Anggota Penguji : Dr. H. M. Imamudin, Lc., M.A
NIP. 19740602 200901 1 010

(.....)

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Dyka Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Puji syukur atas kehadiran Allah *subhanahu wa ta'ala* yang telah memberikan limpahan rahmat, berkah serta hidayah juga kekuatan dan kesabaran sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada bimbingan kita Nabi Muhammad *sallallahu 'alaihi wasallam* yang telah menjadi suri tauladan serta penunjuk jalan yang benar. Semoga Allah *subhanahu wa ta'ala* memberkahi ilmu yang telah saya dapatkan selama menimba ilmu di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Tulisan ini saya persembahkan kepada:

1. Orang tua saya, bapak Samijan dan ibu Yasmi, yang selalu memberikan kasih sayang, motivasi, semangat, dukungan serta do'a dalam setiap hembusan nafasnya.
2. Kakak saya, Abdulah, yang telah memberikan kasih sayang dan dukungannya, serta adik kecil saya, M. Farizki Ardiansyah, yang sangat saya sayangi, juga sahabat ibu saya, ibu Yatun, yang selalu memberikan do'a dan dukungan. Tak lupa segenap keluarga besar saya.
3. Orang tua kedua saya di kota rantau ini yakni pengasuh Pondok Pesantren Mahasiswi Al Azkiya, ustadz Dr. K.H. Achmad Khudori Soleh dan ibu Hj. Erik Sabti Rahmawati, M.A. Terima kasih telah menjadi guru sekaligus orangtua saya, dan memberikan bimbingan, dukungan, nasihat dan suri tauladan serta menjaga saya selama saya berada di kota rantau ini.
4. Sahabat-sahabat seperjuangan saya, Irsyadillah Faqih, Mahda Nurdiana, Sonia Maisuri, Tania Arifka Anggi Pratiwi, Tazkiyyatun Nufus, Mafrudhotin Nadzifah dan Atiek Intan Anggraini yang selalu memberikan dukungan, menemani dan saling membantu dalam keadaan suka maupun duka.
5. Seluruh teman-teman Biologi D 2018 (D'Bams) yang selalu menemani dari awal perkuliahan hingga saat ini.
6. Tak lupa juga kepada seluruh teman-teman Biologi angkatan 2018 atas segenap bantuan, pembelajaran, kenangan serta tali persaudaraan yang telah kita rajut bersama selama ini.
7. Begitu pula kepada seluruh pihak yang telah membantu dan menemani selama penelitian dan penulisan skripsi ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Semoga Allah senantiasa melimpahi kita dengan rahmat serta hidayah-Nya. Aamiin...

MOTTO

“Effort makes you. You will regret someday if you dont do your best now. Don’t think it’s too late but keep going on it”

-Jeon Jungkook-

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Endah Eni

NIM : 18620040

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Malang, 17 Agustus 2022
Yang membuat pernyataan,



Endah Eni
NIM. 18620040

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Endah Eni, Liliek Harianie, M. Imamudin

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Tempe merupakan salah satu produk makanan hasil fermentasi tradisional Indonesia yang dibuat dari kacang kedelai. Tahapan produksi tempe meliputi pencucian, perendaman, pengupasan kulit ari kedelai, dan fermentasi menggunakan *Rhizopus* sp. Proses produksi tempe menghasilkan produk samping berupa limbah. Salah satunya adalah limbah cair, berupa air rendaman kacang kedelai, yang diketahui mengandung bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat banyak dimanfaatkan dalam industri pangan sebagai pengawet makanan karena mampu menghasilkan senyawa antibakteri berupa bakteriosin, yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri penyebab pembusukan pada makanan. Diantara bakteri penyebab pembusukan makanan adalah *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari bakteriosin bakteri asam laktat yang diisolasi dari air rendaman kacang kedelai dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Parameter uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri dari bakteriosin bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe. Data yang didapatkan berupa diameter zona hambat yang terbentuk disekitar *paperdisc*. Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode deskriptif. Penelitian diawali dengan isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat, adapun pengujian yang dilakukan yaitu pewarnaan Gram, pewarnaan endospore, uji katalase dan uji produksi gas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi menghasilkan 8 isolat dimana 4 isolat diduga sebagai bakteri asam laktat dengan 2 genus *Lactobacillus* dan 2 genus *Streptococcus*. Isolat bakteri asam laktat selanjutnya digunakan untuk produksi bakteriosin dan dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak bakteriosin. Hasil pengujian menunjukkan bahwa rata-rata penghambatan terhadap *Bacillus subtilis* lebih besar dibandingkan dengan *Pseudomonas aeruginosa*. Dan rata-rata zona hambat terbesar terdapat pada isolat LT5 dengan kategori sedang.

Kata kunci: *Limbah cair tempe*, *bakteri asam laktat*, *bakteriosin*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteriocin Activity Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Tempe Liquid Waste In Inhibiting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria

Endah Eni, Liliek Harianie, M. Imamudin

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang

ABSTRACT

Tempe is one of the traditional Indonesian fermented food products made from soybeans. The stages of tempeh production include washing, soaking, stripping soybeans, and fermentation using *Rhizopus* sp. The tempe production process produces a by-product in the form of waste. One of them is liquid waste, in the form of soybean soaking water, known to contain lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria are widely used in the food industry as food preservatives because they are able to produce antibacterial compounds in the form of bacteriocins, which can inhibit the growth of pathogenic bacteria and bacteria that cause spoilage in food. Among the bacteria that cause food spoilage are *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of lactic acid bacteria bacteriocin isolated from soybean soaking water in inhibiting the growth of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The test parameter used in this study was the antibacterial activity test of bacteriocin of lactic acid bacteria isolated from tempe liquid waste. The data obtained in the form of the diameter of the inhibition zone formed around the paperdisc. The data were then analyzed using descriptive methods. The study began with the isolation and characterization of lactic acid bacteria, while the tests carried out were Gram staining, endospore staining, catalase test and gas production test. The results showed that the isolation produced 8 isolates where 4 isolates were suspected to be lactic acid bacteria with 2 genera of *Lactobacillus* and 2 genera of *Streptococcus*. The lactic acid bacterial isolates were then used for the production of bacteriocins and antibacterial activity tests were carried out on the bacteriocin extracts. The test results showed that the average inhibition of *Bacillus subtilis* was greater than that of *Pseudomonas aeruginosa*. And the largest average inhibition zone was found in LT5 isolates in the medium category.

Keywords: Tempe liquid waste, lactic acid bacteria, bacteriocin, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

نشاط Bakteriosin بكتيريا لحمض اللاكتات المعزول من نفايات تيمبي في عقبة بكتيريا *Bacillus Pseudomonas aeruginosa و subtilis*

عنده عيني، ليليك هارياني، محمد امام الدين

قسم علم الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا، بالجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك ابراهيم مالانج

الملخص

تيمبي هو أحد المنتجات الغذائية الإندونيسية التقليدية المخمرة المصنوعة من فول الصويا. تشمل مراحل إنتاج تيمبي بالغسل ، والنقع ، و تجريد فول الصويا ، والتخمير باستخدام *Rhizopus sp*. تؤثر عملية إنتاج تيمبي منتجًا ثانويًا في شكل نفايات. واحد منها هو النفايات السائلة ، في شكل ماء نقع فول الصويا. معروف باحتوائه على بكتيريا حمض اللاكتيك. تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في صناعة المواد الغذائية كمواد حافظة للأغذية لأنها قادرة على إنتاج مركبات مضادة للبكتيريا على شكل بكتريوسينات ، والتي يمكن أن تمنع نمو البكتيريا المسببة للأمراض والبكتيريا التي تسبب تلف الطعام. من بين البكتيريا التي تسبب تلف الطعام *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الفعالية المضادة للبكتيريا لبكتيريا حمض اللاكتات المعزول من ماء نقع فول الصويا في عقبة بكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*. كان معامل الاختبار المستخدم في هذه الدراسة هو اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لبكتيريا حمض اللاكتات المعزول من نفايات تيمبي السائلة. البيانات التي تم الحصول عليها في شكل قطر منطقة التثبيط المتكونة حول القرص الورقي. ثم تم تحليل البيانات باستخدام الطرق الوصفية. بدأت الدراسة بعزل وتوصيف بكتيريا حمض اللاكتات ، بينما كانت الاختبارات التي تم إجراؤها هي تلوين الجرام ، وتلوين الأبواغ الداخلية ، واختبار الكاتلاز ، واختبار إنتاج الغاز. أظهرت النتائج أن العزلة أنتجت 8 عزلات حيث اشتبه في أن 4 عزلات من بكتيريا حمض اللاكتات مع جنسين من بكتيريا *Lactobacillus* و 2 جنس من *Streptococcus*. تم استخدام العزلات البكتيرية لحمض اللاكتات لإنتاج Bakteriosin وأجريت اختبارات النشاط المضاد للبكتيريا على مستخلصات Bakteriosin. أظهرت نتائج الاختبار أن متوسط تثبيط بكتيريا *Bacillus subtilis* كان أكبر من مثبط *Pseudomonas aeruginosa*. وتم العثور على أكبر متوسط منطقة تثبيط في عزلات LT5 في الفئة المتوسطة.

الكلمات الرئيسية: الكلمات الرئيسية ، بكتيريا حمض اللاكتات ، Bakteriosin ، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*.

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrahmanirrahiim, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul “Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. yang telah menegakkan diinul Islam yang terpatri hingga akhirul zaman.

Aamiin.

Berkat bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Hariani, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Liliek Harianie AR. M.P dan Dr. H. M. Imamudin, Lc., M.A, selaku dosen pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Muhammad Asmuni Hasyim, M.Si, selaku Dosen wali, yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
6. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang setia menemani penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium tersebut. Serta motivasi kepada penulis.
7. Ayah dan ibuku, dan keluarga tercinta, yang telah memberikan Do'a, dukungan serta motivasi kepada penulis.
8. Teman-teman seperjuangan Biologi dan teman-teman seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Serta para pekerja di pabrik tempe yang sudah memberikan limbah tempe kepada saya secara gratis.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Malang, 15 Februari 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
المخلص	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.5 Batasan Masalah.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Limbah Cair Tempe.....	9
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	11
2.2.1 Lactobacillus	12
2.2.2 Streptococcus	12
2.2.3 Pediococcus.....	13
2.2.4 Leuconostoc	13
2.3 Manfaat Bakteri Asam Laktat	14
2.4 Isolasi Bakteri Asam Laktat	15
2.5 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat.....	16
2.6 Bakteriosin.....	18
2.6.1 Klasifikasi Bakteriosin	19
2.6.2 Produksi Bakteriosin	21
2.6.3 Mekanisme Kerja Bakteriosin.....	22
2.6.4 Aktivitas Antibakteri Bakteriosin	24
2.6.5 Aplikasi Bakteriosin sebagai Biopreservatif Pangan	25
2.7 Bakteri Pembusuk pada Makanan	26
2.7.1 <i>Bacillus subtilis</i>	26
2.7.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian	30

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.3 Alat dan Bahan	30
3.3.1 Alat.....	30
3.3.2 Bahan	30
3.4 Prosedur Penelitian	31
3.4.1 Preparasi Sampel.....	31
3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	31
3.4.3 Pembuatan Media	31
3.4.4 Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	32
3.4.5 Pemurnian Isolat Bakteri Asam Laktat.....	32
3.4.6 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat	32
3.4.6.1 Pewarnaan Gram	32
3.4.6.2 Pewarnaan Endospora	33
3.4.6.3 Uji Katalase	33
3.4.6.4 Uji Pembentukan Gas	34
3.4.7 Pembuatan Inokulum (Kultur aktif).....	34
3.4.8 Produksi Bakteriosin.....	34
3.4.9 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	35
3.4.10 Pengujian Aktivitas Antibakteri Bakteriosin	35
3.5 Analisis Data	36

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik BAL dari Limbah Tempe	37
A. Pewarnaan Gram.....	40
B. Pewarnaan Endospora.....	42
C. Uji Katalase.....	44
D. Uji Pembentukan Gas	45
E. Karakterisasi Genus BAL Berdasarkan <i>Bergey's</i> 1994.....	46
4.2 Uji Aktivitas Bakteriosin	47
4.3 Tinjauan Al Qur'an mengenai Pemanfaatan Bakteriosin	53

BAB V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran	59

DAFTAR PUSTAKA	60
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	69
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1. Karakter morfologi pada koloni bakteri dari limbah tempe.....	39
Tabel 4.2. Zona penghambatan bakteriosin terhadap bakteri uji	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 4.1. Isolat bakteri hasil isolasi BAL dari limbah cair tempe	37
Gambar 4.2. Pewarnaan Gram	46
Gambar 4.3. Pewarnaan endospora.....	43
Gambar 4.4. Uji katalase.....	45
Gambar 4.5. Uji pembentukan gas	46
Gambar 4.6. Uji zona hambat	49

DAFTAR LAMPIRAN

1. Diagram alir penelitian.....	69
2. Dokumentasi penelitian	70
3. Hasil karakteristik BAL dari limbah tempe	76
3.1 Pengamatan makroskopik koloni bakteri.....	76
3.2 Pewarnaan Gram	78
3.3 Pewarnaan endospora.....	80
3.4 Uji katalase.....	83
3.5 Uji pembentukan gas.....	84
4. Hasil uji antibakteri ekstrak bakteriosin terhadap bakteri uji	85
5. Kartu konsultasi pembimbing I.....	87
6. Kartu konsultasi pembimbing II	88
7. Bukti checklist plagiasi	89

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/singkatan	Keterangan
BAL	Bakteri asam laktat
MRSA	De Mann Rogosa Sharpe Agar
MRSB	De Mann Rogosa Sharpe Broth
NA	Nutrient Agar
CaCO ₃	Kalsium karbonat
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
NaCl	Natrium clorida
g	gram
pH	power of Hydrogen

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tempe adalah produk fermentasi tradisional asal Indonesia. Bahan pembuatan tempe adalah kedelai yang difermentasi dengan *Rhizopus* sp. sehingga dihasilkan miselium putih yang membentuk tekstur kompak dan padat (Barus dkk., 2019). Umumnya, proses produksi tempe meliputi beberapa tahapan seperti pencucian kedelai, perendaman atau perebusan kedelai, pengupasan kedelai, dan difementasi menggunakan *Rhizopus* sp. dan terakhir diperoleh tempe yang siap diolah sebelum dikonsumsi (Prabowo dkk., 2018).

Industri pengolahan tempe bukan hanya menghasilkan tempe saja, namun juga akan menghasilkan produk sampingan dalam bentuk limbah. Limbah tempe dikelompokkan menjadi 2, yaitu limbah cair dan semi padat (Purnama, 2016). Limbah cair berupa air rendaman/rebusan dan limbah semi padatan berupa kulit ari kedelai (Prabowo dkk., 2018). Limbah semi padat belum dirasakan dampaknya terhadap lingkungan karena masih memiliki nilai ekonomis yakni digunakan sebagai pakan ternak yang kemudian dijual. Sedangkan limbah cair tidak memiliki nilai ekonomis sehingga sering tidak digunakan kembali, dibuang atau terkadang digunakan sebagai pakan cair untuk ternak (Amaliah dkk., 2018). Hal ini menunjukkan bahwa penanganan limbah cair tempe masih terbilang kurang, melihat ketersediaannya yang banyak.

Limbah cair tempe jika tidak dikelola dengan baik dan hanya langsung dibuang diperairan akan sangat mengganggu lingkungan disekitarnya. Limbah cair yang langsung dibuang ke perairan, dalam waktu yang relatif singkat akan menimbulkan bau busuk dari gas H₂S, amoniak ataupun fosfin sebagai akibat dari terjadinya

fermentasi limbah organik tersebut. Adanya proses pembusukan, akan menimbulkan bau yang tidak sedap. Ketidakseimbangan lingkungan baik fisik, kimia maupun biologis dari perairan yang tercemar limbah dari proses produksi tempe tersebut, dapat mempengaruhi kualitas air dan kehidupan organisme dalam di perairan tersebut. Sehingga, dalam konsentrasi tertentu kehadiran limbah tersebut dapat berdampak negatif terhadap lingkungan juga kesehatan manusia sehingga perlu adanya penanganan terhadap limbah (Purnama, 2016).

Menurut Purnama (2016), limbah cair yang dihasilkan dari proses pembuatan tempe sekitar 1,5-2 m³ per 100 kg kedelai. Namun limbah tersebut tidak digunakan kembali, padahal air hasil rendaman kedelai memiliki kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang cukup tinggi. Pernyataan ini sesuai dengan penelitian Pisol *et al* (2013), dimana BAL telah berhasil diisolasi dari berbagai tahap produksi tempe, dan keberadaan BAL tertinggi ditemukan pada air rendaman. Adanya BAL dalam air rendaman kedelai dikarenakan limbah tersebut mengandung unsur hara yang dapat menjadi media pertumbuhan mikroorganisme seperti BAL. Menurut Suwardiyono, dkk (2019), air rendaman kedelai mengandung 0,11% karbohidrat, 0,42% protein, 0,13% lemak, 4,55% besi, 1,74% fosfor dan 98,8% air. Selain itu, perendaman kedelai merupakan tahap pre-fermentasi kedelai dimana pada tahap tersebut mengakibatkan penurunan pH pada rendaman menjadi sekitar 4.5-5.3, sehingga memungkinkan pertumbuhan bagi BAL (Prabowo dkk., 2018).

Dijelaskan dalam Al-Qur'an bahwa tidak ada satu pun dari ciptaan Allah *subhanahu wa ta'ala* yang sia-sia. Seperti yang telah disebutkan dalam Al-Qur'an surah Ali Imron [3]: 191, yang berbunyi :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطٰلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۙ ۱۹۱

Artinya : “(yaitu) orang-orang yang senantiasa mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi, (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan segala sesuatu ini dengan sia-sia”, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka.” (Q.S. Ali Imron [3]: 191).

Dijelaskan dalam tafsir Jalalain (2008) bahwa dalam lafadz رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا (Ya Tuhan kami, tidakkah Engkau menciptakan ini) maksudnya apa yang kami lihat ini بَطٰلًا (dengan sia-sia), semua merupakan bukti atas sempurnanya kekuasaan-Mu. Dalam ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah *subhanahu wa ta'ala* tidak menciptakan segala sesuatu di langit dan di bumi tanpa manfaat. Dinyatakan dengan jelas bahwa sesungguhnya segala sesuatu ciptaan Allah *subhanahu wa ta'ala* tiada yang sia-sia. Termasuk juga limbah, dimana limbah masih memiliki manfaat apabila diketahui. Sama halnya dengan limbah cair tempe, dimana air rendaman kacang kedelai memiliki kandungan BAL yang cukup tinggi yang bermanfaat bagi kehidupan manusia.

BAL memiliki berbagai manfaat untuk kesehatan tubuh manusia terutama bagi pencernaan (Bella, 2016). BAL juga banyak dimanfaatkan dalam industri makanan. Salah satu peran BAL dalam industri pangan adalah dapat berfungsi sebagai pengawet (Suskovic *et al.*, 2010), yang dapat menjadi alternatif baru dalam penggunaan bahan pengawet makanan dimana kebanyakan masih menggunakan bahan pengawet kimia yang berisiko terhadap kesehatan. Menurut Nurraifah dkk (2021), penggunaan pengawet kimia secara berlebihan berbahaya bagi kesehatan dan menumpuk residu tubuh, sehingga memicu timbulnya bermacam-macam

penyakit termasuk kanker. Penggunaan bahan pengawet alami (biopreservatif) untuk pengawetan pangan dapat menjadi solusi untuk mengatasi masalah tersebut, yaitu bahan pengawet yang secara alami dapat mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen. Bahan pengawet tersebut salah satunya didapat dengan memanfaatkan BAL (Nurraifah dkk., 2021).

BAL dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengawet makanan karena memiliki kemampuan untuk memproduksi zat antibakteri yang bisa mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen enterik. Jenis zat antibakteri yang diproduksi oleh BAL diantaranya hidrogen peroksida, diasetil, asam organik, dan bakteriosin, yakni protein dengan sifat antibakteri (Suskovic *et al.*, 2010). Menurut klasifikasi zat antibakteri yang diproduksi BAL, asam laktat diklasifikasikan sebagai kelompok asam organik dengan asam asetat, dan hidrogen peroksida diklasifikasikan sebagai kelompok senyawa lain bersama asetil dehidra, diasetil, dan karbondioksida (Yang *et al.*, 2012).

Jenis-jenis zat antimikrobia yang diproduksi BAL tersebut dapat dimanfaatkan sebagai pengawet makanan. Asam laktat dan hidrogen peroksida merupakan senyawa antagonis yang menunjukkan aktivitas bakterisida bagi mikroorganisme pembusuk makanan (Meziane *et al.*, 2011). Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL memiliki sifat sebagai antibakteri. Semakin tinggi tingkat asam laktat yang dihasilkan, semakin kuat kemampuannya dalam menekan bakteri indikator. Namun penggunaan asam laktat dapat berpengaruh terhadap rasa dari bahan yang diawetkan, sehingga perlu untuk dipertimbangkan lebih lanjut (Sulistiani, 2017). Sedangkan senyawa lain, seperti hidrogen peroksida dan diasetil membutuhkan

konsentrasi tinggi untuk menghasilkan aktivitas antimikrobia yang efektif (Rahmawati dkk., 2005).

Bakteriosin adalah salah satu zat antimikrobia yang dapat digunakan sebagai pengawet makanan. Bakteriosin merupakan senyawa antibakteri yang disintesis secara ribosomal oleh berbagai jenis bakteri, termasuk BAL (Kusmarwati dkk., 2014). Bakteriosin yang diproduksi BAL berpotensi sebagai pengawet makanan (Kasi dkk., 2017), dan memiliki spektrum yang luas terhadap aktivitas penghambatan bakteri patogen pada makanan (Riadi dkk., 2020). Menurut Toldra (2007), bakteriosin dapat meningkatkan kualitas dan keamanan produk daging dengan mencegah pertumbuhan bakteri patogen, seperti *L. monocytogenes* dan mikroorganisme pembusuk.

Beberapa keunggulan bakteriosin sehingga berpotensi sebagai biopreservatif pangan antara lain diakui sebagai zat yang aman, tidak beracun dan mudah dirombak oleh enzim proteolitik, tidak berbahaya bagi mikrobiota usus, mampu meminimalisir penggunaan pengawet kimia, tahan terhadap perlakuan asam dan basa, serta perlakuan panas dan dingin, memiliki spektrum antimikroba yang relatif luas, serta mampu menghambat banyak patogen bawaan makanan dan bakteri pembusuk (Galvez *et al.*, 2007). Pemanfaatan bakteriosin dalam industri makanan mampu meminimalisir penggunaan pengawet kimia, juga perlakuan panas intensif. Selain itu, bakteriosin dari BAL juga dikatakan sangat menarik karena termasuk bahan tambahan pangan yang tidak beracun dan aman dalam mengawetkan makanan serta mampu mencegah pembusukan makanan oleh bakteri patogen (Kusmarwati dkk., 2014).

Bacillus subtilis dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri penyebab pembusukan makanan. Hal ini sesuai pendapat Ndahawali (2016), yang menyebutkan bahwa beberapa bakteri yang menyebabkan pembusukan adalah bakteri Gram negatif yaitu bakteri dari genus *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersnia* dan *Achromobacter*, serta bakteri Gram positif yaitu bakteri dari genus *Bacillus*, *Clostridium* dan *Listeria*. Menurut Khaira, dkk (2019), *Bacillus* merupakan salah satu agen penyebab pembusukan pada makanan dan timbulnya berbagai penyakit. *Bacillus* termasuk dalam bakteri gram positif. Bakteri ini menghasilkan amilisin yaitu suatu racun tahan panas. Racun tersebut akan tetap ada dalam makanan meskipun telah melalui proses pemasakan, sehingga dapat menjadi salah satu penyebab timbulnya penyakit (Purnamasari, 2015). Sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif yang termasuk salah satu bakteri penyebab pembusukan. Bakteri ini mengganggu sistem pencernaan manusia dengan adanya enterotoksin, akibatnya dapat menyebabkan keracunan makanan (Widowati dkk., 2014).

Melihat latar belakang tersebut, penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri bakteriosin dari BAL yang diisolasi dari limbah cair tempe sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri ini digunakan sebagai bakteri indikator, karena bakteri tersebut umum dijumpai sebagai agen penyebab pembusukan makanan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apa karakteristik genus bakteri asam laktat yang ada dalam limbah cair tempe?

2. Bagaimana aktivitas antibakteri dari bakteriosin bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui genus bakteri asam laktat dari limbah cair tempe.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri dari bakteriosin bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Memberi informasi tentang genus bakteri asam laktat yang terdapat pada limbah cair tempe.
2. Memberi informasi ilmiah tentang aktivitas antibakteri dari bakteriosin bakteriosin bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Limbah cair tempe yang dipakai untuk penelitian adalah limbah cair rendaman kacang kedelai.
2. Limbah cair tempe yang digunakan didapatkan dari produsen tempe di Sanan, Sentra Industri Tempe Kota Malang.
3. Bakteri yang diisolasi adalah bakteri asam laktat.

4. Metode yang digunakan dalam isolasi bakteri adalah pengenceran bertingkat dengan metode *pour plate* sebagai penginkulasian pada media MRSA.
5. Karakterisasi bakteri dilakukan secara makroskopis dengan mengamati karakter morfologi sel bakteri, serta secara mikroskopis melalui beberapa uji yaitu pewarnaan Gram, endospora, pengujian katalase, dan pengujian pembentukan gas.
6. Karakterisasi BAL mengacu pada buku *Bergey's 1994*.
7. Bakteri indikator yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai bakteri penyebab pembusukan makanan.
8. Bakteriosin didapatkan dari isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair rendaman kacang kedelai.
9. Bakteriosin yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kasar bakteriosin.
10. Parameter yang diamati adalah daya hambat bakteriosin terhadap bakteri indikator.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Cair Tempe

Tempe adalah produk fermentasi asal Indonesia, yang termasuk makanan sehari-hari untuk sebagian besar warga Indonesia (Rahayu dkk., 2015). Hal ini dikarenakan kedelai, sebagai bahan baku tempe memiliki harga yang murah, namun nilai gizinya setara dengan sumber protein hewani seperti susu sapi, telur ayam, dan daging sapi (Sutrisno, 1992). Tempe umumnya diproduksi dalam skala industri rumah tangga atau usaha kecil menengah, dengan skala produksi berkisar antara 10 kg hingga 10 ton per hari (Rahayu dkk., 2015). Proses produksi tempe meliputi perendaman atau perebusan kedelai, pengupasan kulit kedelai, serta tahap fermentasi menggunakan *Rhizopus* sp. Proses perendaman kedelai merupakan proses pre-fermentasi dimana bakteri asam laktat tumbuh secara spontan. Tahap pre-fermentasi kedelai mengakibatkan terjadinya penurunan pH menjadi 4.5–5.3 dimana pH tersebut memungkinkan pertumbuhan bagi bakteri asam laktat (Prabowo dkk., 2018).

Industri tempe bukan menghasilkan tempe saja, melainkan juga memproduksi produk samping yang disebut limbah. Limbah tempe merupakan limbah yang dihasilkan pada proses pembuatan tempe, yang dapat berbentuk limbah padat dan cair. Dampak limbah padat bagi lingkungan belum terasa karena limbah tersebut umumnya digunakan kembali sebagai pakan ternak, namun limbah cair akan menghasilkan bau yang tidak sedap yang akan mencemari sungai jika dibuang langsung ke sungai (Khoiria, 2008).

Menurut Nurhasanah dan Pramudyanto (1991), macam-macam limbah cair tempe diantaranya adalah sisa air rendaman/sisa rebusan kacang kedelai dan limbah

tempe yang sudah keruh dengan warna kuning keabu-abuan, yang apabila didiamkan akan menjadi hitam serta menimbulkan bau tidak sedap. Meskipun begitu, limbah cair tempe masih dapat dimanfaatkan diantaranya digunakan sebagai makanan ternak, dimanfaatkan dalam pembuatan *nata de soya*. Namun, pemanfaatan limbah cair tempe belum begitu banyak, sehingga lebih sering akan dibuang begitu saja.

Setiap kuintal kedelai dalam proses pembuatan tempe menghasilkan 1,5-2 m³ limbah cair (Khoiria, 2008). Jumlah limbah cair tempe terbilang sangat tinggi, sehingga dapat menyebabkan tercemarnya lingkungan, namun limbah tersebut juga berpotensi sebagai sumber bakteri potensial. Keberadaan bakteri juga telah dijelaskan dalam Al-Qur'an yakni surah Yunus [10]: 61, yang berbunyi :

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْءَانٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْرُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ٦١

Artinya : *"Dan tidakkah engkau (Muhammad) berada dalam suatu urusan, dan tidak membaca suatu ayat Al-Qur'an serta tidak pula kamu melakukan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu ketika kamu melakukannya. Tidak lengah sedikit pun dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah, baik di bumi ataupun di langit. Tidak ada sesuatu yang lebih kecil dan yang lebih besar daripada itu, melainkan semua tercatat dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)."* (Q.S. Yunus [10]: 61).

Berdasarkan tafsir Jalalain (2008), lafadz ذَرَّةٌ dalam ayat tersebut memiliki makna semut yang paling kecil. Sedangkan Al-Qurthubi (2008), mengatakan bahwa lafadz ذَرَّةٌ artinya sebesar timbangan atom atau disebut juga sebagai seekor semut merah kecil. Ditinjau dari ilmu fisika, atom merupakan partikel yang terkecil dari suatu zat (Supriadi dan Nuraini, 2019). Sedangkan apabila didasarkan pada ilmu

hayat, makna نَرَّةٌ merujuk pada keberadaan mikroorganisme, yakni makhluk hidup berukuran sangat kecil, misalnya bakteri. Menurut Jawetz *et al.* (2004) dalam Holderman, dkk (2017), bakteri merupakan sekelompok mikroorganisme prokariotik yang hidup berkoloni serta tidak memiliki selubung inti tetapi dapat hidup diberbagai tempat. Hal ini termasuk juga seperti adanya BAL dalam limbah cair rendaman kacang kedelai pada tempe.

2.2 Bakteri Asam Laktat

BAL dikasifikasikan sebagai bakteri Gram positif dengan bentuk bulat dan batang, non-spora serta memproduksi asam laktat yang merupakan produk akhir dari proses metabolisme utama selama fermentasi (Okfrianti dkk., 2018). BAL termasuk kelompok bakteri probiotik non patogen, tumbuh pada suhu optimum $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dengan pH sekitar 3,5-10, negatif katalase dan positif oksidase (Putri dkk., 2018). BAL bersifat anaerob fakultatif yang dapat hidup di berbagai habitat, misalnya tumbuhan, saluran pencernaan manusia dan hewan, juga di berbagai makanan dan minuman fermentasi seperti kedelai, yoghurt dan sake (Suwayvia, 2017).

Secara umum, BAL diklasifikasikan dalam 4 genus: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* dan *Lactobacillus*. Namun, berdasarkan pada revisi terbaru, BAL diklasifikasikan dalam 10 genus antara lain *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Vagococcus* dan *Tetragenococcus* (Rahayu dan Margino, 1997).

BAL mempunyai kandungan Guanin dan Sitosin (G + C) yang rendah serta toleran terhadap asam dan digolongkan sebagai bakteri Gram positif. Fungsi utama

BAL adalah untuk memproduksi asam laktat, yang dapat digunakan untuk mengasamkan makanan. Hal ini berarti aplikasi utama BAL adalah sebagai kultur starter dalam industri makanan yang merupakan produk fermentasi seperti fermentasi susu, buah, daging, sayuran, ikan, dan produk sereal. Beberapa genus BAL yang umumnya dimanfaatkan sebagai kultur starter produk makanan fermentasi yaitu *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (Bintsis, 2018).

2.2.1 Lactobacillus

Genus *Lactobacillus* memiliki beberapa karakteristik antara lain digolongkan sebagai bakteri Gram positif, memiliki bentuk batang (*bacil*), tidak motil, mampu tumbuh dengan pH kisaran 4,4 (Cho *et al.*, 2013). *Lactobacillus* diklasifikasikan sebagai bakteri heterogenus. Bakteri ini terdiri atas 135 spesies dan 27 subspecies. Keunggulan dari genus ini yaitu dapat digunakan sebagai probiotik, karena tahan terhadap garam empedu dan pH rendah, dapat menghasilkan zat antibakteri, serta bersifat antagonistik terhadap patogen enterik. Beberapa spesies dari genus *Lactobacillus* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik antara lain *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp.*, *L. rhamnosus*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, dan *L. lactis* (Hidayat dkk., 2018).

2.2.2 Streptococcus

Streptococcus merupakan bakteri Gram positif yang termasuk famili *Streptococcaceae*, berbentuk coccus, yang dapat memfermentasi karbohidrat, bersifat fakultatif anaerob, non-motil, non-spora, dengan negatif katalase. Genus *Streptococcus* terdiri dari hampir 40 spesies teridentifikasi (Suardana dkk., 2021).

Streptococcus dapat digunakan untuk memfermentasi produk makanan maupun minuman. Spesies yang sering digunakan dalam fermentasi produk antara lain *S. thermophiles*, *S. lactis*, *S. salivarius*, *S. cremoris* dan *S. intermedius* (Hidayat dkk., 2018).

2.2.3 Pediococcus

Pediococcus digolongkan sebagai Gram positif dengan bentuk kokus, tidak motil, non-endospora serta tidak menghasikan gas, dapat tumbuh pada pH 4,2 dan suhu 45°C (Wikandari dkk., 2012). Sel bakteri ini membelah menjadi 2 bagian, sehingga sel-selnya berpasangan, tetrad, atau bahkan dalam bentuk cluster sferis besar. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif serta memerlukan lingkungan kaya akan nutrisi dan gula untuk difermentasi. Pediococcus merupakan bakteri homofermentatif yang hanya akan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir (Moreno-Arribas dan Carmen, 2009).

2.2.4 Leuconostoc

Genus Leuconostoc dicirikan sebagai bakteri Gram positif, dengan bentuk coccus (bulat), negatif katalase, non-motil, dapat tumbuh pada suhu 15-45°C, non spora, dan termasuk anaerob fakultatif (Sari dkk., 2012). Leuconostoc termasuk heterofermentatif yakni dapat melakukan fermentasi gula, dan diubah menjadi asam laktat dan senyawa lainnya misalnya etanol, CO₂ dan asam asetat (Hutkins, 2006). BAL heterofermentatif dapat merombak glukosa dan mengubahnya menjadi ± 50% asam laktat, sementara sisanya berupa zat lain seperti etanol, asetaldehid, diasetil, asam asetat dan CO₂ (Fauzi dkk., 2012).

2.3 Manfaat Bakteri Asam Laktat

BAL tergolong sebagai bakteri menguntungkan, karena memiliki peran penting dalam dunia pangan dan kesehatan. BAL dalam industri pangan berperan dalam meningkatkan cita rasa makanan (Suardana dkk., 2018). Menurut Ayivi *et al.* (2020), BAL selain menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir, juga menghasilkan zat organik yang berkontribusi terhadap rasa, tekstur, dan aroma sehingga menghasilkan sifat organoleptik yang unik. Produksi atau degradasi eksopolisakarida, lipid dan protein, serta produksi komponen nutrisi seperti vitamin menjadikan BAL sebagai kultur fungsional, sehingga dapat memberikan efek terapeutik serta dapat digunakan sebagai agen probiotik (Bintsis, 2018).

BAL banyak dimanfaatkan di bidang kesehatan sebagai pangan fungsional dalam bentuk probiotik. Hal ini karena BAL memiliki sifat antibakteri, sehingga mampu menghentikan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit pada sistem pencernaan (Suardana dkk., 2018). Sebagai sumber probiotik, BAL memiliki kandungan asam amino rantai pendek sehingga dapat mengurangi tekanan darah, meningkatkan sistem imun dan mampu mengurangi kolesterol dalam tubuh (Okfrianti dkk., 2018).

Hal penting dari BAL yaitu kemampuannya dalam menghasilkan komponen antibakteri, terutama bakteriosin yang memiliki potensi sebagai biopreservatif pangan sehingga dapat digunakan sebagai pengganti pengawet kimia. BAL banyak dimanfaatkan sebagai bahan pengawet alami karena memiliki efek pengawetan terhadap produk yang dihasilkannya (Suardana dkk., 2018). Bakteriosin mampu mengawetkan produk makanan dikarenakan bakteriosin memiliki efek

penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme patogen serta pembusuk (Suwayvia, 2017).

2.4 Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi mikroba merupakan usaha untuk menumbuhkan mikroba di luar habitat aslinya. Isolasi mikroba memiliki tujuan untuk mendapat biakan mikroba yang tidak lagi bercampur bersama mikroba lainnya sehingga diperoleh biakan murni. Isolasi mikroba dapat dilakukan dari berbagai substrat misalnya udara, tanah, bunga, ranting tumbuhan, buah, daun-daun, serta minuman dan makanan fermentasi (misalnya tape, tuak, cider) juga air (Andiani, 2012). Beberapa faktor yang penting untuk diperhatikan saat melakukan isolasi mikroba diantaranya sifat mikroba yang akan diisolasi, kesesuaian media tumbuh, metode inokulasi mikroba, metode pengujian mikroba yang telah diisolasi yang mana disesuaikan pengujian apa yang akan dilakukan, serta cara pemeliharaan mikroba yang telah diisolasi sehingga diperoleh kultur murni (Handayani dkk., 2016).

Mikroba yang telah berhasil diisolasi dibiakkan dalam media pertumbuhan. Jenis media yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba digunakan sebagai sumber nutrisi bagi mikroba. Terdapat berbagai macam jenis media yang digunakan sebagai media pertumbuhan mikroba, tetapi penggunaannya tergantung dari jenis mikroba yang akan ditumbuhkan (Andani, 2012). BAL umumnya tumbuh pada media spesifik yang disebut media MRS (Safitri dkk., 2016). BAL tumbuh pada media dengan ditandai adanya zona jernih di sekitar koloni. Zona jernih tersebut merupakan kalsium laktat, yaitu produk akhir hasil reaksi asam laktat yang diproduksi oleh BAL bersama CaCO_3 dalam media MRS. Zona jernih tersebut menjadi indikator penentuan koloni bakteri yang akan dilakukan pemurnian

(Sumual dkk., 2019). CaCO_3 bertindak sebagai penyangga serta untuk menyeleksi bakteri yang mengandung asam laktat. Penambahan CaCO_3 bertujuan agar menghasilkan asam laktat lebih banyak serta mengatur pH media (Aritonang *et al.*, 2017).

2.5 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi adalah tahap awal dari proses identifikasi yang diawali dengan pengamatan bentuk morfologi (Megasari dkk., 2012). Morfologi bakteri penting untuk diamati agar memudahkan proses identifikasi bakteri. Hal ini dikarenakan sifat koloni bakteri menentukan spesies bakteri. Pengamatan morfologi meliputi ukuran, tepian, elevasi, warna, dan bentuk koloni bakteri yang dilihat secara makroskopis (Holderman dkk., 2017). Data yang diperoleh dari hasil karakterisasi, selanjutnya digunakan untuk proses identifikasi bakteri yang didasarkan pada buku identifikasi bakteri yaitu *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Megasari dkk., 2012).

Pengamatan selanjutnya yaitu pengamatan secara mikroskopis, diantaranya adalah pengamatan karakter morfologi sel berdasarkan pewarnaan Gram untuk melihat bentuk dan warna sel bakteri (Dewi dkk., 2019). Pewarnaan Gram adalah proses terpenting untuk mengidentifikasi isolat bakteri. Apabila berwarna ungu, bakteri diklasifikasikan dalam Gram positif sedangkan apabila berwarna merah, diklasifikasikan dalam bakteri Gram negatif. Perlu juga dilakukan uji katalase untuk mendeteksi keberadaan enzim katalase pada suatu isolat. Pengamatan secara mikroskopis pada BAL diantaranya pewarnaan Gram, endospora, pengujian katalase, dan fermentasi asam laktat (Amaliah dkk., 2018).

- a. Pewarnaan Gram adalah teknik pewarnaan terpenting dalam menggolongkan bakteri, termasuk bakteri Gram positif ataukah negatif. Pewarnaan Gram memiliki prinsip yaitu apabila ditetesi zat warna *crystal violet*, dan bakteri dapat mengikat zat warna tersebut sehingga sel bewarna ungu maka digolongkan ke dalam bakteri Gram positif. Sedangkan apabila bakteri melepaskan zat warna *crystal violet* setelah dilakukan pencucian dengan alkohol, tetapi menyerap pewarna safranin sehingga sel bewarna merah, maka digolongkan sebagai bakteri Gram negatif (Putri dan Endang, 2018).
- b. Pewarnaan endospora bertujuan untuk membedakan spora dari sel vegetatif. Prinsip pewarnaan endospora yaitu apabila ditetesi dengan *malachite green* bakteri dapat menyerap zat warna tersebut sehingga bewarna hijau, maka bakteri digolongkan sebagai bakteri pembentuk spora. Sedangkan bakteri non-spora, sel vegetatifnya akan terlihat merah (Amaliah dkk., 2018). BAL tidak membentuk endospora sehingga tampak sel vegetatifnya yaitu merah muda, tidak berwarna hijau, yang menandakan dibentuknya endospora (Laily dkk., 2013).
- c. Pengujian katalase dilakukan untuk menentukan aktivitas katalase terhadap bakteri yang diuji. Hampir sebagian besar bakteri menghasilkan enzim katalase yang mampu merombak H_2O_2 menjadi O_2 dan H_2O (Aritonang *et al.*, 2017). BAL merupakan bakteri yang tergolong negatif katalase. Hal ini karena BAL tidak menghasilkan enzim katalase, sehingga tidak dapat mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Suardana dkk., 2018).
- d. Fermentasi asam laktat pada BAL dikelompokkan dalam 2 kelompok yakni heterofermentatif dan homofermentatif. Homofermentatif merupakan proses

fermentasi yang menghasilkan asam laktat saja. Berbeda dengan homofermentatif, heterofermentatif merupakan proses fermentasi yang memproduksi bermacam-macam senyawa lain selain asam laktat, misalnya asam asetat, etanol dan CO₂ (Yanti dan Faiza, 2013).

2.6 Bakteriosin

Asam laktat merupakan produk utama yang diproduksi oleh kelompok BAL pada proses fermentasi. Namun, BAL juga mampu memproduksi senyawa antimikroba. Senyawa antibakteri yang diproduksi BAL diantaranya adalah hidrogen peroksida, diasetil, asam organik dan bakteriosin, yang merupakan protein/polipeptida dengan sifat antibakteri (Suskovic *et al.*, 2010).

Bakteriosin merupakan komponen ekstraseluler yang berupa peptide atau protein antibakteri yang bersifat antagonis terhadap bakteri lain (Okfrianti dkk., 2018). Beberapa genus BAL dapat memproduksi senyawa protein yaitu bakteriosin. Bakteriosin bersifat bakterisidal pada bakteri Gram positif serta Gram negatif. Beberapa genus BAL yang dapat menghasilkan bakteriosin antara lain *Pediococcus*, *Lactococcus* dan *Lactobacillus* yang berasal dari bermacam bahan pangan (Harianie, 2013).

Bakteriosin yang dihasilkan BAL memiliki sifat menguntungkan bagi industri pangan, terutama dalam industri produk fermentasi. Hal ini disebabkan karena bakteriosin memiliki aktivitas antimikroba yang mampu menekan pertumbuhan bakteri lain, misalnya bakteri penyebab pembusukan dan bakteri penyebab patogen pada makanan (*food borne illness*). Manfaat penggunaan bakteriosin pada makanan antara lain dapat mencegah pembusukan, memperpanjang umur simpan serta

mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen juga bakteri pembusuk (Suwayvia, 2017).

Bakteriosin adalah pengawet alami yang dianggap aman. Hal ini karena bakteriosin dapat diuraikan oleh enzim proteolitik dalam lambung manusia dan hewan (Suwayvia, 2017). Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga memiliki untuk digunakan sebagai biopreservatif adalah (Galvez *et al.*, 2007):

1. Dianggap sebagai zat yang aman dan tidak beracun
2. Tidak berbahaya bagi mikrobiota usus, karena mudah dicerna enzim pencernaan,
3. Mampu mengurangi pemanfaatan pengawet kimia pada makanan,
4. Tahan terhadap perlakuan asam dan basa, juga perlakuan dingin dan panas, karena stabil terhadap pH dan suhu,
5. Memiliki spektrum antibakteri yang relatif luas,
6. Serta mampu melawan berbagai macam patogen bawaan makanan dan bakteri pembusuk.

2.6.1 Klasifikasi Bakteriosin

Bakteriosin pertama kali diklasifikasikan oleh Klaenhammer (1993) menjadi 4 kelompok, yaitu kelas I: *post-translationally modified bacteriocins*, kelas II: *unmodified peptides*, kelas III: *unmodified proteins*, dan kelas IV: *complex proteins*. Klasifikasi tersebut kemudian direvisi dan diklasifikasikan kembali sebagai berikut (Yang *et al.*, 2014):

1. Kelas I: *post-translationally modified bacteriocins* (Lantibiotik)

Kelas I adalah bakteriosin lantibiotik yang dimodifikasi pasca-translasi, yakni bakteriosin dengan kurang dari 28 asam amino serta peptida aktif membran

berukuran kecil (<5kDa) (Yang *et al.*, 2014). Bakteriosin pada kelas ini merupakan bakteriosin yang telah mengalami modifikasi enzimatik selama biosintesis, dengan menggabungkan non-tradisional asam amino seperti lanthionine, methyl-lanthionine, dehydrobutyrine, dan dehydroalanine, sehingga berdampak pada sifatnya (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

2. Kelas II: *unmodified bacteriocins* (Non-lantibiotik)

Bakteriosin kelas II adalah bakteriosin dengan 30-60 asam amino (<10kDa), yang memiliki sifat unik yaitu toleran terhadap panas dan tidak dimodifikasi.

Bakteriosin kelas II dibagi lagi menjadi lima subkelas yaitu (Yang *et al.*, 2014):

- a. Bakteriosin kelas IIa adalah peptida aktif yang dapat menghambat genus *Listeria*. Bakteriosin kelas ini memiliki ukuran protein antara 27-48 asam amino, dengan ciri didaerah N-terminal terdapat urutan asam amino, contohnya pediocin PA-1 dan carnobacteriocin X.
- b. Bakteriosin kelas IIb adalah bakteriosin dengan dua peptida tanpa dimodifikasi. Hal ini karena bakteriosin kelas ini memiliki kandungan dua peptida berbeda untuk membentuk struktur aktif kompleks, seperti lactacin F dan ABP-118.
- c. Bakteriosin kelas IIc adalah bakteriosin dengan peptida sirkular, seperti carnocyclin A dan enterocin AS-48.
- d. Bakteriosin kelas IId adalah bakteriosin dengan peptida tunggal yang linier, non-pediosin, termasuk epidermisin NI01 dan laktokoksin A.
- e. Bakteriosin kelas IIe adalah modifikasi pasca-translasi dari tipe *siderophore* non-ribosom pada daerah terminal karboksi yang kaya akan serin, seperti mikrosin E492, karena mikrosin E492 diisolasi dari

Klebsiella pneumonia, yang bukan merupakan bakteri Gram-positif, bakteriosin kelas IIe harus dikategorikan ke mikrosin bakteri Gram-negatif.

3. Kelas III

Bakteriosin kelas III adalah bakteriosin yang memiliki berat molekul besar (>30kDa) dengan protein yang tidak stabil terhadap panas. Kelas III dapat dibagi lagi menjadi dua kelompok yang berbeda. Bakteriosin golongan A merupakan enzim bakteriolitik yang membunuh galur sensitif melalui lisis sumur sel, seperti Enterolisin A. Bakteriosin Grup B adalah protein non-litik seperti Caseicin 80 dan Helveticin J (Yang *et al.*, 2014).

2.6.2 Produksi Bakteriosin

Bakteriosin merupakan protein antibakteri dari BAL yang disintesis oleh ribosom. Sintesis bakteriosin terjadi pada fase eksponensial dalam tahap pertumbuhan sel. Sintesis ini dikendalikan oleh plasmid dari DNA ekstrakromosomal. Faktor utama yang mempengaruhi sintesis ini pH. Sekresi propeptida berlangsung pada saat fase eksponensial dan maksimal saat fase stasioner (Hafsan, 2014).

Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi bakteriosin antara lain pH, suhu, fase pertumbuhan serta sumber karbon. Selain itu, jenis sumber nitrogen dan karbon serta kandungan garam dalam media produksi juga dapat berpengaruh pada laju pertumbuhan sel bakteri, sehingga akan mempengaruhi produksi bakteriosin (Hafsan, 2014).

Proses sintesis bakteriosin terdiri dari 5 tahap, yaitu: a). Pembuatan kultur BAL dalam media MRSB,; b). Isolasi atau produksi bakteriosin, produksi bakteriosin

menggunakan media *Trypton-glukosa-yeast ekstrak* (TGE); c). Pengujian aktivitas antibakteri bakteriosin, yakni dengan metode difusi cakram maupun sumuran; d). Pengujian karakterisasi senyawa bakteriosin, yakni pengkarakterisasian supernatan dari bakteriosin. Pengujian karakterisasi antara lain pengujian kestabilan bakteriosin terhadap pH, suhu, enzim, dan juga larutan surfaktan, serta berbagai parameter lainnya. e). Pemurnian bakteriosin, yakni melalui elektroforesis yang digunakan untuk menentukan ukuran molekul, dan dilanjutkan dengan menentukan jenis asam amino dari bakteriosin (Hafsan, 2014).

2.6.3 Mekanisme Kerja Bakteriosin

Bakteriosin dari BAL memiliki target utama yaitu membran sitoplasma bakteri pada sel yang sensitif. Hal ini dikarenakan respon pertama bakteriosin yaitu merusak permeabilitas membran sel juga mereduksi *proton motive force* (PMF), akibatnya bakteriosin dapat mengganggu produksi ATP serta sintesis protein (Hafsan, 2014). PMF adalah gradien elektrokimia yang melintasi membran sitoplasma, yang terbagi menjadi potensial membran juga gradien pH (Suwayvia, 2017).

Peran PMF dalam mengatur sintesis ATP serta akumulasi ion dan metabolit lain. Sel target yang telah diinduksi dengan aktivitas bakteriosin menyebabkan turunnya PMF. Penurunan PMF mengakibatkan kematian pada sel target dengan cara menghentikan reaksi yang menghasilkan ATP. Rendahnya ATP pada sel menyebabkan pengangkutan nutrisi dalam sel tidak dapat berlangsung serta konsentrasi molekul kofaktor seperti K^+ dan Mg^{+} tidak dapat dipertahankan. Akibatnya akan terjadi kematian pada sel (Suwayvia, 2017).

Mekanisme kerja aktivitas bakterisidal dari bakteriosin yakni: (1) molekul terjadinya kontak langsung bakteriosin dan membran sel, (2) terjadinya gangguan potensial membran yakni tidak stabilnya membran sitoplasma akibat dari adanya kontak langsung, akibatnya sel menjadi melemah, dan (3) membran menjadi tidak stabil, yang akhirnya dapat mempengaruhi pembentukan pori-pori atau lubang pada membran sel dengan mengganggu PMF, sehingga akan terjadi kebocoran membran sitoplasma. Molekul seluler yang keluar masuk menunjukkan terjadinya kebocoran sel yang disebabkan karena terbentuknya lubang pada membran sitoplasma. Kebocoran tersebut menyebabkan turunnya gradien pH seluler. Terbentuknya pori pada sitoplasma adalah dampak dari aktivitas bakteriosin. Aktivitas tersebut mengakibatkan terjadinya berubahnya gradien potensial membran serta lepasnya molekul intraseluler dan substansi ekstraseluler (lingkungan) masuk ke dalam sel. Akibatnya, dapat menghambat pertumbuhan sel dan menyebabkan kematian pada sel (Hafsan, 2014).

Secara umum bakteri Gram positif memiliki kisaran sensitivitas yang luas terhadap bakteriosin, sedangkan bakteri Gram negatif lebih resisten terhadap bakteriosin. Bakteriosin dari BAL tidak efektif membunuh bakteri Gram-negatif. Hal ini karena bakteri Gram negatif memiliki membran luar hidrofilik, yang dapat mengganggu metabolisme bakteriosin. Hal ini disebabkan bakteri Gram negatif memiliki sistem selektif terhadap zat asing yang terdapat pada lipopolisakarida. Namun, bakteri gram negatif dapat menjadi sensitif jika struktur lipopolisakarida pada permukaan sel rusak (Hafsan, 2014).

2.6.4 Aktivitas Antibakteri Bakteriosin

Bakteriosin umumnya memiliki sifat bakterisida dan memiliki spektrum sempit terhadap bakteri lain yang berkerabat dekat. Aktivitas antibakteri bakteriosin terhadap bakteri patogen dapat ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat. Pengujian aktivitas antibakteri bakteriosin dapat dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi dilakukan dengan membentuk sumur atau menggunakan kertas cakram. Aktivitas antibakteri didasarkan pada diameter zona jernih di sekeliling cakram atau sumur (Fatimah dkk., 2020). Kriteria aktivitas penghambatan menurut Lingga *et al* (2016), yakni dikatakan aktivitas hambat lemah jika diameter zona bening < 5 mm, penghambatan sedang jika diameter zona bening 5-10 mm, hambatan kuat jika diameter zona bening 10-20 mm, dan hambatan sangat kuat jika > 20 mm.

Aktivitas antibakteri dapat diamati menggunakan beberapa metode, yaitu metode dilusi, metode difusi agar, dan metode difusi dilusi. Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antibakteri. Ada 3 cara dari metode difusi yang dapat dilakukan yaitu metode sumuran, metode cakram, dan metode silinder (Nurhayat dkk., 2020). Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Balaouri *et al.*, 2016).

Metode difusi cakram dilakukan dengan menggunakan kertas cakram sebagai media untuk menyerap zat antimikroba. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan biakan

bakteri uji, kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Daerah zona bening di sekitar kertas cakram diamati untuk menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan mikroba. Kelebihan dari metoda cakram yaitu dapat dilakukan pengujian dengan lebih cepat pada penyiapan cakram (Nurhayat dkk., 2020).

2.6.5 Aplikasi Bakteriosin sebagai Biopreservatif Pangan

Bakteriosin yang diproduksi BAL berpotensi sebagai pengawet alami makanan (Kasi *et al.*, 2017). Bakteriosin digunakan sebagai alternatif pengawet alami karena dapat mengurangi pembusukan makanan dengan menghentikan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit dan bakteri penyebab pembusukan (Nurraifah *et al.*, 2021).

Bakteriosin dari BAL sangat bermanfaat bila digunakan dalam industri makanan, khususnya dalam proses fermentasi. Hal ini dikarenakan bakteriosin memiliki sifat antibakteri yang dapat membantu mengurangi pertumbuhan bakteri penyebab pembusukan makanan dan bakteri patogen penyebab keracunan makanan. Keunggulan penggunaan bakteriosin dari BAL sebagai biopreservatif antara lain tidak beracun dan tidak mengubah rasa atau tekstur makanan, mudah terdegradasi karena merupakan protein, dan tidak berbahaya untuk mikroflora usus karena enzim pada sistem pencernaan dapat mencerna bakteriosin dengan mudah (Hafsan, 2014). Sifat bakterisidal bakteriosin berpotensi menjadi alternatif antibakteri yang diakui aman serta efektif (Fatimah *et al.*, 2020).

Beberapa strategi yang dapat digunakan untuk menerapkan bakteriosin sebagai biopreservatif makanan: 1) Inokulasi BAL (produksi insitu) pada pangan yang menghasilkan bakteriosin pada pangan, seperti proses fermentasi pangan. 2) menambahkan bakteriosin sebagai pengawet makanan yang digunakan untuk

mengawetkan bahan makanan segar seperti daging, ikan dan buah-buahan segar. 3) menggunakan produk yang difermentasi dengan strain penghasil bakteriosin digunakan, misalnya, sebagai komponen dalam formulasi makanan untuk produksi keju (Hafsan, 2014).

2.7 Bakteri Pembusuk pada Makanan

Bakteri yang tumbuh pada makanan dibagi dalam 2 kelompok, antara lain: bakteri pembusuk yang menyebabkan kerusakan pada makanan dan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit pada manusia. Jumlah bakteri pembusuk umumnya lebih banyak daripada bakteri patogen (Suwayvia, 2017). Contoh bakteri patogen antara lain *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sedangkan contoh bakteri pembusuk antara lain *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. dan *Micrococcus* sp. (Suwito, 2010).

2.7.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah sekelompok bakteri Gram positif, bersifat saprofit, memiliki bentuk batang, aerobik, serta mampu membentuk spora. Bakteri tersebut dapat tumbuh dengan suhu optimum sekitar 25–35°C dengan pH 7-8 (Khaira dkk., 2019). *Bacillus subtilis* memiliki ukuran sekitar 0,3-2,2 x 1,2-7,0 µm dan berflagel peritrikus, aerob atau anaerob fakultatif, heterotrofik dan positif-katalase. Permukaan sel bakteri ini ditumbuhi flagellum peritrikus secara merata (Djaenuddin dan Amran , 2015).

Spesies *Bacillus* disebut sebagai agen penyebab pembusukan pada makanan dan penyebab timbulnya berbagai macam penyakit. Salah satu contoh kerusakan makanan yang disebabkan oleh kelompok bakteri ini adalah menyebabkan timbulnya bau busuk pada produk makanan berasam. Umumnya, kerusakan yang

ditimbulkan oleh bakteri ini terjadi pada produk makanan kemasan (Rorong dan Wiesje, 2020).

Kerusakan mikrobiologi makanan kemasan dapat dibedakan atas dua kelompok, yaitu (1) tidak terbentuk gas, dan (2) terbentuk gas. Salah satu contoh kerusakan makanan kemasan yang disebabkan oleh mikroba yang tidak membentuk gas misalnya kerusakan “*flat sour*” (busuk asam tanpa gas), kemasan terlihat normal tetapi produk di dalamnya menjadi asam. Bakteri penyebab kerusakan ini misalnya kelompok *Bacillus* yang dapat tumbuh pada makanan berasam rendah seperti produk sosis, bakso, kornet, opor ayam, tuna kemasan. Kerusakan makanan tersebut ditandai dengan kemasan datar, kenampakan tidak berubah, tetapi pH menurun (asam), bau agak menyimpang, dan kadang-kadang cairan menjadi keruh (Rorong dan Wiesje, 2020).

Selain sebagai bakteri pembusuk, *Bacillus* juga teridentifikasi sebagai bakteri yang dapat menghasilkan zat bau. Hal ini dikarenakan bakteri tersebut merupakan bakteri penghasil amonia yang dapat menyebabkan timbulnya bau busuk. *Bacillus* juga dapat menyebabkan timbulnya noda-noda berwarna merah pada ikan (Ndahawali, 2016). Selain itu, menurut Purnamasari (2015), 2 species dari genus *Bacillus* yaitu *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*, juga banyak menyebabkan kontaminasi pada makanan, sehingga dapat menimbulkan keracunan. Keracunan makanan yang disebabkan oleh species dari genus *Bacillus* ditunjukkan dengan munculnya gejala seperti kejang (kram) perut, diare dan muntah (Jawetz *et al.*, 2001).

Keberadaan *B. subtilis* dalam makanan menyebabkan timbulnya penyakit karena bakteri ini dapat menghasilkan amilosin, yaitu toksin yang tahan terhadap

panas, walaupun telah melalui proses pemasakan racun tersebut akan tetap berada pada makanan dan menimbulkan penyakit (Purnamasari, 2015). Beberapa penyakit yang ditimbulkan oleh *Bacillus subtilis* diantaranya adalah gastroenteritis akut, endokarditis, meningitis, infeksi mata, dan lain-lainnya (Jawetz *et al.*, 2001).

2.7.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah sekelompok bakteri Gram negatif, dengan bentuk batang, motil, aerob, positif-katalase, oksidase positif, tidak dapat melakukan fermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain dan tersebar secara luas di tanah, air, manusia, hewan dan tumbuh-tumbuhan, (Widowati dkk., 2014). *P. aeruginosa* mampu tumbuh dengan keadaan minim oksigen dan nutrisi. Kisaran suhu untuk bakteri ini dapat tumbuh adalah sekitar 4-42°C (Dharmayanti dan Sukrama, 2019).

P. aeruginosa adalah jenis bakteri penyebab pembusukan pada makanan. Hal ini dikarenakan bakteri ini dapat menghasilkan enzim yang dapat mengubah komponen lemak juga protein yang terdapat pada makanan. Kerusakan yang ditimbulkan oleh bakteri ini antara lain terbentuknya lendir dan pigmen pada daging meskipun penyimpanan pada suhu lemari es, menimbulkan bercak dan noda pada mentega, serta bau tidak sedap dan ketengikan pada bahan pangan (Novidar dkk., 2018).

Selain sebagai bakteri pembusuk, *P. aeruginosa* juga bersifat patogen pada manusia. Bakteri ini terkadang hidup berkoloni di tubuh manusia serta menyebabkan infeksi jika sistem pertahanan tubuh rendah (Widowati dkk., 2014). Umumnya, infeksi yang disebabkan oleh bakteri tersebut tidak mudah untuk diobati, karena bakteri *P. aeruginosa* resisten pada sebagian besar antibiotik

(Sanjaya dkk., 2019). Bakteri ini juga mengganggu saluran pencernaan manusia melalui enterotoksin, sehingga dapat menyebabkan keracunan makanan (Widowati dkk., 2014). Gangguan pada pencernaan yang biasanya terjadi adalah mual, muntah, diare dan kram perut (Arvina dkk., 2017).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksploratif. Penelitian eksplorasi dilakukan dengan mengisolasi bakteri asam laktat dari air limbah perendaman kedelai yang diperoleh dari produsen tempe dan kemudian mengkarakterisasi isolat yang diperoleh. Isolat bakteri asam laktat dari hasil isolasi digunakan untuk produksi bakteriosin dan diuji aktivitas bakteriosinnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April–Mei 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow*, kaca slide, penutup preparat, mikroskop, jarum ose, pinset, bunsen, tabung reaksi, tabung Durham, rak tabung reaksi, autoklaf, Erlenmeyer, timbangan analitik, gelas ukur, cawan petri, kulkas, mikropipet, *blue tip*, sentrifuge, *magnetic stirrer*, *shaker incubator*, *hot plate*, pH meter, tabung eppendorf, dan inkubator.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air limbah perendaman kedelai, media MRSA, aquades steril, media MRSB, CaCO₃ 1%, pewarna *crystal violet*, pewarna *Malachite green*, iodine, H₂O₂ 3%, alkohol 70%, alkohol 96%, safranin, *yeast extract* 2%, NaOH, media NA, larutan NaCl, kertas saring, kertas

cakram, kertas label, aluminium foil, plastikwrap, kapas, plastik, karet, tisu, kain kasa, minyak imersi dan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1. Preparasi Sampel

Sampel limbah cair rendaman kacang kedelai diambil dari produsen tempe di Sanan, Sentra Industri Tempe Kota Malang, Jawa Timur. Sampel dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi bakteri asam laktat.

3.4.2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dilakukan dengan cara membungkus semua alat dan bahan menggunakan *aluminium foil* lalu dibungkus dengan plastik tahan panas. Selanjutnya sterilisasi dilakukan dengan *autoclave* menggunakan suhu 121°C dan tekanan 1 atm sekitar 15-30 menit.

3.4.3. Pembuatan Media

Media MRSA dibuat dengan melarutkan 6,82 g dalam 100 ml akuades, media MRSB dibuat dengan melarutkan 5,51 g dalam 100 ml akuades, dan media NA dibuat dengan melarutkan 2,0 g dalam 100 ml akuades. Semua bahan tersebut kemudian dididihkan di atas *hot plate*, dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm sekitar 15 menit (Harianie, 2013).

3.4.4. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sampel diambil sebanyak 1 ml secara aseptik dan ditambahkan 9 ml larutan garam (NaCl) (0,85%, b/v), kemudian dihomogenkan. Selanjutnya, dilakukan pengenceran secara bertahap sampai diperoleh pengenceran 10^{-7} . Tiga seri terakhir pengenceran diambil 1 mL dan dikultur pada MRSA yang telah ditambahkan

CaCO₃ 1% dengan metode *pour plate*. Kultur tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 48 jam (Amaliah dkk, 2018).

3.4.5. Pemurnian Isolat Bakteri Asam Laktat

Koloni yang tumbuh pada MRSA dengan adanya zona jernih di sekitarnya selanjutnya dimurnikan dengan cara digoreskan diatas MRSA yang telah ditambahkan CaCO₃ 1% menggunakan metode kuadran, kemudian dimasukkan dalam inkubator 37°C selama 24 jam, sehingga hanya diperoleh satu koloni tunggal. Koloni kemudian dikultur lebih lanjut untuk mendapatkan satu galur murni (Amaliah dkk, 2018).

3.4.6. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi isolat dilakukan berdasarkan pengamatan makroskopis, meliputi pengamatan morfologi yaitu warna, bentuk, tepi, elevasi, dan ukuran koloni. Selain itu, dilakukan pengamatan mikroskop termasuk pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji katalase dan uji pembentukan gas. Data hasil karakterisasi kemudian ditentukan sesuai dengan buku "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*".

3.4.6.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang didapatkan termasuk Gram positif atau negatif. Pewarnaan Gram dimulai dengan ditetaskan sebanyak 2 tetes NaCl fisiologis pada *object glass* lalu satu ose sampel bakteri diambil dan diratakan kemudian dilakukan pengfiksasian melewati bunsen yang menyala. Selanjutnya, pewarnaan dilakukan dengan meneteskan pewarna *crystal violet* pada preparat sekitar 2-3 tetes lalu didiamkan sekitar 60 detik, lalu dibilas akuades. Berikutnya preparat ditetesi iodin sekitar 1-2 tetes kemudian didiamkan

kembali sekitar 60 detik dan dibilas akuades. Berikutnya, preparat ditetesi alkohol 96% sekitar 30 detik lalu dibilas akuades. Terakhir, ditetesi Safranin sekitar 2-3 tetes dan didiamkan sekitar 45-60 detik lalu dibilas akuades. Preparat yang telah jadi, dikeringkan anginkan agar dapat diamati dibawah mikroskop. Sebelum diamati, preparat ditetesi dengan minyak emersi. Apabila koloni bakteri tampak berwarna ungu berarti tergolong Gram positif sedangkan apabila tampak berwarna merah berarti tergolong bakteri Gram negatif (Amaliah dkk., 2018).

3.4.6.2 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan dengan diteteskannya dua tetes larutan garam fisiologis pada *object glass* lalu sampel bakteri diambil sebanyak satu ose dan diratakan kemudian difiksasi di atas nyala api. Preparat selanjutnya ditempatkan diatas penangas air dan ditutup dengan kertas saring. Selanjutnya preparat ditetesi *Malachite green* hingga basah dan didiamkan sekitar 5 menit, kemudian dicuci dengan akuades dan dilepaskan kertas saring. Selanjutnya, preparat ditetesi pewarna Safranin dan didiamkan sekitar 1 menit, lalu dicuci. Selanjutnya preparat diangin-anginkan agar kering sehingga dapat diamati dibawah mikroskop. Sebelum diamati, preparat ditetesi dengan minyak emersi. Apabila tampak berwarna hijau berarti dikatakan dapat membentuk endospora dan apabila tampak berwarna merah berarti dikatakan tidak dapat membentuk endospora (Amaliah dkk., 2018).

3.4.6.3 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan diteteskannya H_2O_2 3% pada preparat. Sampel bakteri diambil dan diletakkan pada *object glass*. Selanjutnya, preparat ditetesi dengan menggunakan H_2O_2 3% sebanyak 2-3 tetes dan diamati. Jika terdapat gelembung udara, berarti bakteri dikatakan katalase positif, sedangkan apabila tidak

terdapat gelembung udara berarti bakteri dikatakan katalase negatif (Amaliah dkk., 2018).

3.4.6.4 Uji Pembentukan Gas

Uji pembentukan gas dilakukan dengan cara diambil 1 ose dari koloni bakteri lalu dicelupkan dalam tabung reaksi yang didalamnya diisi tabung Durham dan media MRS broth. Selanjutnya tabung reaksi diinkubasi dengan suhu 37°C sekitar 48 jam. Jika terbentuk gas dalam tabung Durham, maka bakteri dikatakan heterofermentatif, namun jika tidak terbentuk gas dalam tabung Durham, maka bakteri dikatakan homofermentatif (Amaliah dkk., 2018).

3.4.7. Pembuatan Inokulum (Kultur aktif)

Pembuatan inokulum mengacu pada Harianie (2013), isolat hasil peremajaan BAL masing-masing diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 25 ml MRSB, selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 100 rpm hingga 18-24 jam menggunakan *shaker incubator*.

3.4.8. Produksi Bakteriosin

Proses produksi bakteriosin kasar mengacu pada Razak et al (2009) dalam Harianie (2013), diinokulasi setiap inokulum yang dibuat sebanyak 5 ml lalu ditambahkan pada 45 ml *yeast extract* 2% (b/v) dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam, sampai nilai pH medium menjadi sekitar 4.

Filtrat hasil fermentasi dipisahkan dari endapan sel dengan dilakukan sentrifugasi pada 4500 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya filtrat disaring dengan kertas Whatman No. 1, kemudian filtrat bebas sel dilakukan penetralan menggunakan NaOH 1N sampai pH sekitar 7. Semua langkah ini

dilakukan pada suhu rendah 4°C. Filtrat hasil fermentasi merupakan ekstrak kasar bakteriosin yang akan digunakan untuk penelitian lebih lanjut (Razak *et al.* 2009 dalam Harianie 2013).

3.4.9. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Diinokulasikan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* sekitar 1 ose dalam 10 ml larutan NaCl 0,9%. Tabung kemudian dihomogenkan dengan *vortex* dan diatur tingkat kekeruhannya dengan disamakan pada larutan standar Mc Farland 0.5 (Amaliah dkk., 2018).

Komposisi larutan standar Mc Farland terdiri dari 0,05 ml larutan barium klorida 1,175% dan 9,95 ml asam sulfat 1%. Langkah kerja pembuatan larutan standar Mc Farland adalah dengan menempatkan barium klorida dan asam sulfat dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan. Apabila kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan larutan Mc Farland, maka konsentrasi suspensi bakteri adalah 10^8 CFU/mL (Fatisa, 2013).

3.4.10. Pengujian Aktivitas Bakteriosin

Pengujian aktivitas antibakteri bakteriosin dilakukan dengan metode difusi cakra menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai bakteri indikator. Dituang media NA pada cawan petri. Selanjutnya, suspensi bakteri uji diratakan menggunakan *cotton swab* dan dibiarkan kering (Effendi dkk., 2016).

Disiapkan ekstrak bakteriosin, kemudian cakram steril berdiameter 6 mm dicelupkan dalam ekstrak bakteriosin sekitar 30 menit. Selanjutnya, kertas cakram ditempatkan pada media NA yang telah ditambahkan suspensi bakteri indikator. Cawan tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam.

Aktivitas bakteriosin kemudian diukur berdasarkan zona jernih yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Gunakan jangka sorong untuk mengukur diameter zona bening aktivitas bakteriosin yang dihasilkan di sekitar kertas cakram (Sidabutar dkk, 2015).

3.5 Analisis Data

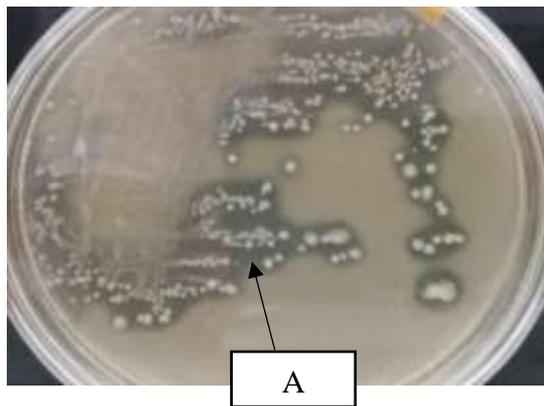
Data yang diperoleh dari uji aktivitas bakteriosin diukur dari diameter zona jernih yang terbentuk disekeliling kertas cakram. Analisis data dilakukan dengan metode deskriptif. Data penelitian disusun dalam tabel dan diklasifikasikan membentuk suatu rangkaian data kemudian diinterpretasikan berdasarkan pengamatan yang ada.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik BAL Dari Limbah Cair Tempe

Isolasi BAL dari limbah cair tempe yang telah dilakukan berhasil mendapatkan 8 isolat yang diindikasikan mampu tumbuh pada media MRS Agar dengan ditandai adanya zona jernih disekitar koloni bakteri. Menurut Sumual dkk (2019), BAL tumbuh pada media agar dengan ditandai adanya zona jernih di sekitar koloni. Zona jernih tersebut merupakan kalsium laktat, yaitu produk akhir hasil reaksi antara asam laktat yang diproduksi oleh BAL bersama dengan CaCO_3 dalam media MRS Agar. Zona jernih tersebut menjadi indikator penentuan koloni bakteri yang akan dilakukan pemurnian. CaCO_3 bertindak sebagai penyangga serta untuk menyeleksi bakteri yang mengandung asam laktat. Penambahan CaCO_3 bertujuan agar menghasilkan asam laktat lebih banyak serta mengatur pH media (Aritonang *et al.*, 2017).



Gambar 4.1. Isolat bakteri hasil isolasi BAL dari limbah cair tempe, A) zona jernih pada koloni bakteri

Keseluruhan isolat tersebut selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi koloni. Menurut Sousa *et al.* (2013), morfologi koloni dapat menjadi indikator dari

variasi fenotipik suatu koloni bakteri, karena berdasarkan karakter morfologinya dapat diketahui proses adaptasi bakteri terhadap lingkungannya. Menurut Wardhani dkk (2020), isolat bakteri yang diperoleh selanjutnya dilakukan identifikasi dengan cara diamati sifat morfologi dari bakteri yang tumbuh. Hal ini dikarenakan bentuk koloni yang tumbuh dapat berbeda-beda pada setiap bakteri.

Pengamatan morfologi dilakukan melalui pengamatan makroskopis berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan pengamatan mikroskopis berdasarkan morfologi sel serta dilakukan pengujian biokimia. Karakter yang digunakan dalam pengamatan makroskopis yakni berdasarkan dari ukuran, tepian, bentuk dan warna koloni bakteri. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan berdasarkan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora yang diamati dibawah mikroskop sehingga diketahui bentuk sel bakteri. Selain itu, juga dilakukan pengujian biokimia yang meliputi uji katalase dan uji pembentukan gas.

Menurut Surbakti dan Hasanah (2019), pengamatan morfologi koloni BAL dilakukan berdasarkan bentuk, tepi dan warna koloni bakteri. Dwijoseputro (2005), menyebutkan bahwa pengamatan makroskopis pada morfologi koloni bakteri meliputi pengamatan bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni. Sedangkan, pengamatan secara mikroskopis meliputi pengamatan terhadap bentuk sel bakteri yang dilihat berdasarkan pengamatan dibawah mikroskop sehingga diketahui bakteri berbentuk bulat (*coccus*) atau berbentuk batang (*bacil*) (Suryani, 2020). Menurut Okfrianti dkk (2018), BAL merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk bulat dan batang, tidak menghasilkan spora, bersifat anaerob fakultatif, katalase negatif dan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir metabolisme utama.

Tabel 4.1. Karakteristik morfologi koloni dan sel bakteri dari limbah cair tempe

Kode Isolat	Morfologi Koloni				Morfologi Sel			
	Bentuk	Tepian	Warna	Elevasi	Ukuran (mm)	Bentuk	Gram	Katalase
LT 1	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,46	<i>Coccus</i>	-	+
LT 2	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,63	<i>Coccus</i>	-	+
LT 3	Bulat	Rata	Putih	Cembung	0,89	<i>Coccus</i>	+	-
LT 4	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,52	<i>Bacil</i>	+	-
LT 5	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,28	<i>Bacil</i>	+	-
LT 6	Bulat	Rata	Putih	Cembung	0,73	<i>Coccus</i>	+	-
LT 7	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,75	<i>Coccus</i>	-	+
LT 8	Bulat	Rata	Putih	Cembung	1,16	<i>Coccus</i>	-	+

Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 4.1 diketahui bahwa koloni yang diamati mempunyai tepian, elevasi, bentuk dan warna yang sama yaitu tepian rata, elevasi cembung, dengan bentuk bulat dan warna putih. Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diketahui bahwa semua isolat mempunyai ciri morfologi seperti ciri-ciri BAL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sulmiyati *et al.* (2018), yang mengatakan bahwa koloni yang diperkirakan sebagai bakteri asam laktat berdasarkan pengamatan makroskopik, isolat memiliki ukuran diameter 0,5-2 mm, dengan bentuk melingkar dengan tepi rata, permukaan cembung, dan warna putih susu. Hasil pengamatan isolat bakteri dapat dilihat pada lampiran 3.1.

Pengamatan selanjutnya yaitu secara mikroskopik. Terdapat beberapa cara pengamatan mikroskopik antara lain pewarnaan Gram dan endospora, serta dilakukan uji biokimia yang meliputi uji katalase dan uji pembentukan gas. Dilakukan pengamatan mikroskopik untuk mengidentifikasi bentuk dan sifat sel bakteri. Menurut Holt *et al.* (1994), pengamatan mikroskopik meliputi pewarnaan Gram juga pengujian biokimia.

Proses identifikasi dilakukan untuk mengkarakterisasi BAL yang tumbuh. Isolat yang digunakan untuk pengamatan adalah kultur isolat murni. Pengamatan mikroskopis dilakukan berdasarkan pengamatan ciri morfologi meliputi bentuk sel, susunan sel, warna Gram dan warna endospora yang diamati secara mikroskopis, serta uji katalase. Proses identifikasi ini biasanya hanya dapat diidentifikasi pada tingkat genus, bukan pada tingkat spesies (Surono, 2004).

A. Pewarnaan Gram

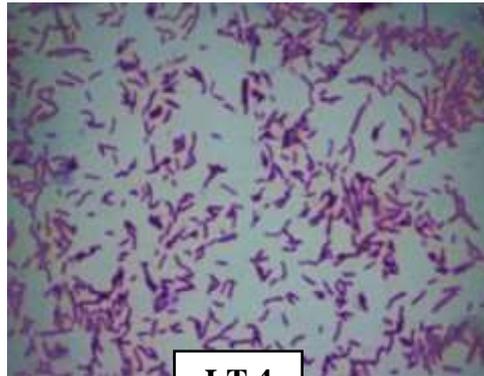
Salah satu teknik pewarnaan yang digunakan sebagai penentuan suatu bakteri termasuk Gram positif atau negatif adalah melalui pewarnaan Gram. Tujuan dari pewarnaan gram yaitu untuk mengkarakterisasi isolat melalui perbedaan struktur dinding sel bakteri (Kurnia *et al.*, 2020). Prinsip pewarnaan Gram yaitu pada bakteri Gram positif akan terlihat warna ungu. Hal ini dikarenakan bakteri dapat berikatan dengan zat warna *Crystal violet*. Sedangkan pada Gram negatif akan terlihat warna merah. Hal ini dikarenakan bakteri tidak mampu berikatan dengan zat warna *Crystal violet*, setelah dilakukan pembilasan dengan alkohol 96%, sehingga bakteri menjadi tidak memiliki warna lagi, akibatnya bakteri akan berikatan dengan zat warna terakhir yang diberikan yaitu safranin (Putri dan Endang, 2018).

Pewarnaan Gram dilakukan dengan menggunakan 4 jenis zat warna yaitu *Crystal violet* sebagai pewarna utama, Iodine sebagai pewarna mordant yaitu zat warna yang berfungsi untuk memperkuat pengikatan warna oleh bakteri, alkohol 96% sebagai pelarut dan Safranin. sebagai pewarna penutup. Hasil pewarnaan Gram pada 8 isolat menunjukkan bahwa 4 isolat merupakan Gram negatif dan 4 isolat lainnya termasuk Gram positif, sehingga 4 isolat ini diperkirakan sebagai BAL. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 3.2.

Sifat Gram bakteri berkaitan erat dengan sifat fisik serta sifat kimia dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif dan negatif memiliki perbedaan struktur dinding sel, dimana bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri Gram negatif mengandung lipid yang tebal. Perbedaan tersebut mengakibatkan bakteri Gram positif memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap *Crystal violet* dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Hal tersebut memungkinkan bakteri Gram positif mampu membentuk ikatan kompleks antara *Crystal violet*-lugol, akibatnya saat ditetesi dengan alkohol 96%, sel akan mengalami dehidrasi yang menyebabkan pori-pori mengecil dan permeliabilitasnya berkurang sehingga pewarna utama tetap ada. Hal tersebut menjadikan sel akan tetap terlihat ungu (Purwaningsih dan Wulandari, 2021).

Hasil pengamatan melalui mikroskop pada 4 isolat Gram positif yang diduga bakteri asam laktat menunjukkan terdapat 2 isolat dengan sel bakteri berbentuk basil (batang) yang diduga termasuk genus *Lactobacillus*, sedangkan 2 isolat lainnya menunjukkan sel bakteri berbentuk *coccus* (bulat) yang diduga termasuk dalam genus *Streptococcus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putri *et al.* (2018) yang menyebutkan bahwa BAL dari genus *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri antara lain bakteri Gram positif dengan bentuk batang, koloni berwarna putih susu atau juga krem, dengan ukuran 0,5-1,2 x 0,5-1,5 μ m. Menurut Sulmiyati dkk. (2018), karakter morfologi bakteri asam laktat genus *Streptococcus* berbentuk bulat dan koloni berwarna putih susu, elevasi cembung, dan tepi rata. Hasil pengamatan morfologi bakteri *Streptococcus* oleh Vos *et al.* (2009), menunjukkan koloni *Streptococcus* berukuran 0,5-1,0 mm pada media dan hidup dalam kondisi aerob dan anaerob.

Menurut Putri dkk (2018), pewarnaan Gram pada pengujian mikrobiologi diagnostik dapat mengklasifikasikan bakteri dalam 4 kategori sederhana yaitu Gram positif bulat (*coccus*), Gram positif batang (*basil*), Gram negatif bulat (*coccus*) dan Gram negatif batang (*basil*). Gambar 4.2 terlihat pewarnaan pada bakteri yang menunjukkan koloni dengan bentuk batang (*basil*) Gram positif.



Gambar 4.2. Pewarnaan Gram, Keterangan: LT4, Bakteri Berbentuk Batang Gram positif. Perbesaran: 1000x.

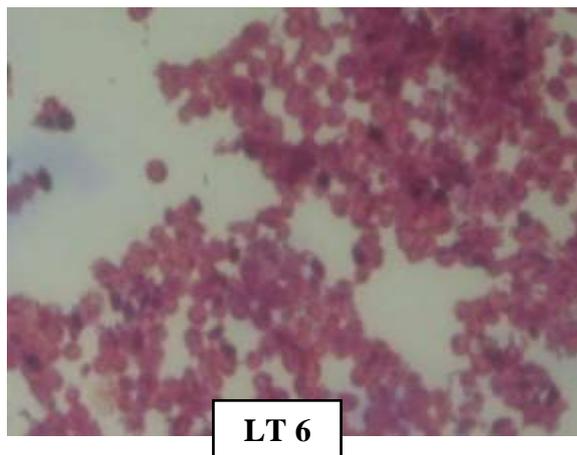
B. Pewarnaan Endospora

Identifikasi selanjutnya adalah dengan pewarnaan endospora. Endospora merupakan mekanisme bakteri yang diatur dalam upaya mempertahankan diri dari pengaruh buruk lingkungan luar (Oktari *et al.*, 2017). Endospora berfungsi sebagai sistem pertahanan diri bakteri dari kondisi yang tidak menguntungkan seperti kondisi kering, panas dan asam. Bakteri yang membentuk endospora sangat sulit untuk diwarnai, oleh karena itu diperlukan zat warna khusus yaitu *malachite green* (Pratita dan Surya, 2012).

Bakteri yang membentuk spora akan berikatan kuat dengan zat warna *malachite green*, sehingga pada saat ditambahkan zat warna berikutnya sel spora tidak akan mengikat zat warna lain. Hal ini karena sel-sel spora telah terikat pada pewarna *malachite green*, yang menyebabkan sel-sel spora berubah menjadi hijau.

Sedangkan, bakteri yang tidak membentuk spora tidak tahan terhadap pewarnaan karena tidak memiliki spora hanya ada sel vegetatif saja. Sebenarnya sel vegetatif dapat berikatan dengan zat warna *malachite green*, namun akan memudar setelah dicuci karena sel vegetatif tidak mampu mengikat warna *malachite green* dengan kuat. Akibatnya, setelah ditetesi pewarna safranin, sel vegetatif akan berikatan dengan safranin sehingga sel berwarna merah muda (Pratita dan Surya, 2012).

Hasil pewarnaan endospora yang telah dilakukan menunjukkan bahwa keseluruhan isolat bakteri yang didapatkan memiliki sel berwarna merah muda, sehingga bakteri tersebut dikatakan tidak membentuk endospora (Hasil pewarnaan endospora dapat dilihat pada lampiran 3.3). Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat dapat diperkirakan sebagai BAL. Menurut Laily *et al* (2013), endospora negatif termasuk ciri umum BAL. BAL tidak menghasilkan endospora, sehingga ketika diwarnai, sel vegetatif akan terlihat merah muda. Menurut Khalid (2011), BAL tidak menghasilkan endospora karena dapat membahayakan tubuh manusia. Menurut Wohlgemuth dan Kampfer (2014), makanan yang terkontaminasi spora bakteri kemungkinan menyebabkan keracunan.



Gambar 4.3. Pewarnaan endospora, Keterangan: LT6, warna merah (negatif endospora). Perbesaran: 1000x.

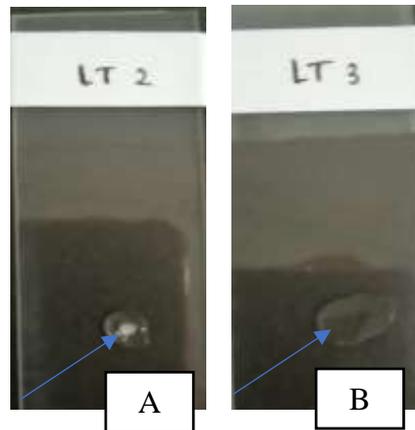
C. Uji Katalase

Pengujian katalase merupakan salah satu pengujian biokimia menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2) sebagai indikator untuk mengetahui kemampuan BAL dalam memproduksi enzim katalase. Hidrogen peroksida (H_2O_2) yang digunakan sebanyak 3%. Bakteri dikatakan katalase positif, apabila terdapat gelembung ketika ditetesi dengan hidrogen peroksida (H_2O_2). Sebaliknya, bakteri dikatakan katalase negatif, apabila tidak terdapat gelembung ketika ditetesi dengan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hal ini sesuai dengan pernyataan Toelle *et al.* (2014), mengatakan bahwa positif katalase ditandai dengan munculnya gelembung udara (O_2).

Uji katalase digunakan untuk mengidentifikasi beberapa kelompok bakteri, serta untuk mengetahui aktivitas katalase dari bakteri tersebut. Sebagian besar bakteri menghasilkan enzim katalase, yang dapat menguraikan H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Aritonang *et al.*, 2017). BAL adalah sekelompok bakteri katalase-negatif. Hal ini dikarenakan BAL tidak memproduksi enzim katalase, sehingga tidak dapat menguraikan H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Suardana dkk., 2018).

Hasil pengujian katalase yang telah dilakukan menunjukkan bahwa dari 8 isolat yang diuji terdapat 4 isolat merupakan katalase positif, yaitu isolat dengan kode LT 1, LT 2, LT 7 dan LT 8, sedangkan 4 isolat lainnya yaitu LT 3, LT 4, LT 5 dan LT 6 merupakan kelompok katalase negatif (Hasil uji katalase dapat dilihat pada lampiran 3.4). Hal ini dapat disimpulkan bahwa 4 isolat dengan katalase negatif diperkirakan termasuk kelompok bakteri asam laktat. Menurut Utama dkk. (2018), BAL termasuk katalase negatif. Reaksi negatifnya ditunjukkan dengan tidak terdapat gelembung udara, ketika ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, sedangkan reaksi positif ditunjukkan dengan terdapat gelembung udara, ketika

ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Terbentuknya gelembung-gelembung gas menandakan bahwa terbentuk gas O_2 dari penguraian H_2O_2 oleh enzim katalase dari bakteri tersebut.



Gambar 4.4. Uji katalase, Keterangan: A) Positif Katalase, B) Negatif Katalase.

D. Uji Pembentukan Gas

BAL dikelompokkan dalam 2 tipe fermentasi, yakni: 1) kelompok homofermentatif, yakni kelompok bakteri asam laktat yang hanya mampu memproduksi satu jenis komponen saja yaitu dengan mengubah glukosa menjadi produk utamanya, 2) kelompok heterofermentatif, yakni kelompok bakteri asam laktat yang memproduksi asam laktat dalam jumlah kecil, tetapi mampu memproduksi bermacam-macam senyawa lain, misalnya asam asetat, etanol, dan asam format (Rahmadi, 2019).

Hasil uji pembentukan gas pada 8 isolat menunjukkan bahwa keseluruhan isolat dikelompokkan dalam kelompok homofermentatif. Hal ini ditandai dengan tidak adanya gelembung gas dalam tabung Durham. Hasil pengamatan mengenai uji pembentukan gas pada isolat BAL dapat dilihat pada lampiran 3.5. Menurut Suardana dkk (2018), bakteri yang bersifat homofermentatif tidak dapat memproduksi gas CO_2 . Hal ini karena bakteri homofermentatif tidak memiliki

enzim piruvat oksidase yang mampu mengubah piruvat menjadi karbondioksida dan asetil fosfat diikuti produksi hidrogen peroksida.



Gambar 4.5. Uji pembentukan gas, Keterangan: Homofermentatif.

E. Karakterisasi Genus Bakteri Asam Laktat Berdasarkan *Bergey's 1994*

Hasil karakterisasi yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa didapatkan 4 isolat yang diperkirakan sebagai bakteri asam laktat. Dua isolat merupakan genus *Lactobacillus* dan 2 lainnya merupakan genus *Streptococcus*. Genus *Lactobacillus* yakni isolat dengan kode LT 4 dan LT 5, dengan ciri-ciri termasuk Gram positif dengan koloni berbentuk batang, endospora negatif, katalase negatif dan fermentasi tipe homofermentatif.

Ciri tersebut sesuai dengan buku *Bergey's (1994)* yang menyatakan bahwa genus *Lactobacillus* memiliki sel berbentuk batang memanjang, tetapi terdapat pula yang berbentuk kokus berukuran $0,5-1,2 \times 1,0-10,0 \mu\text{m}$ dan biasanya berantai pendek. Genus *Lactobacillus* termasuk bakteri Gram-positif, non-spora, tidak bergerak, berflagela peritrik dan anaerob fakultatif, tetapi juga bakteri aerob dan anaerob. Koloni pada agar biasanya berdiameter sekitar 2-5 mm, elevasi cembung, dengan tepi utuh serta tidak berpigmen. Produk akhir fermentasi adalah asam laktat. Tumbuh pada suhu optimum sekitar $30-40^{\circ}\text{C}$. *Lactobacillus* banyak terdistribusi pada makanan nabati dan hewani, saluran pencernaan burung, dan vagina mamalia.

Dua isolat lainnya merupakan genus *Streptococcus*. Genus *Streptococcus* yakni isolat dengan kode LT 3 dan LT 6, dengan ciri termasuk Gram positif dengan koloni bulat, endospora negatif, negatif katalase dan fermentasi tipe homofermentatif. Karakteristik tersebut sesuai dengan buku *Bergey's* (1994), yang mengatakan bahwa genus *Streptococcus*, sel berbentuk bulat atau bulat telur, rantai pendek, tetapi ada juga yang rantai panjang. Genus *Streptococcus* termasuk Gram-positif, bakteri non-motil, tidak membentuk spora, anaerob fakultatif, namun beberapa termasuk aerobik. Ukuran koloni pada media agar biasanya kecil, kurang dari 1 mm. Fermentasi karbohidrat termasuk tipe homofermentatif, dengan asam laktat sebagai produk akhir. Genus ini tersebar luas di alam, hewan, serta produk fermentasi makanan dan minuman.

4.2 Uji Aktivitas Bakteriosin

Bakteriosin adalah produk metabolit sekunder BAL yang bersifat antibakteri, sehingga dapat digunakan sebagai biopreservatif alami. Isolat BAL yang digunakan dalam produksi bakteriosin ini adalah isolat BAL yang telah diisolasi sebelumnya yakni isolasi dilakukan dari limbah cair tempe. Isolasi yang telah dilakukan berhasil mendapatkan 4 isolat BAL yang selanjutnya digunakan untuk memproduksi ekstrak bakteriosin, yaitu isolat dengan kode LT 3, LT 4, LT 5 dan LT 6. Genus dari isolat yang digunakan adalah isolat dengan kode LT 4 dan LT 5 merupakan genus *Lactobacillus*, sedangkan isolat dengan kode LT 3 dan LT 6 merupakan genus *Streptococcus*.

Pengujian aktivitas antibakteri bakteriosin dilakukan dengan uji zona hambat. Aktivitas bakteriosin dari isolat BAL ditunjukkan dengan munculnya zona jernih di sekeliling kertas cakram. Semakin besar zona jernih maka semakin besar

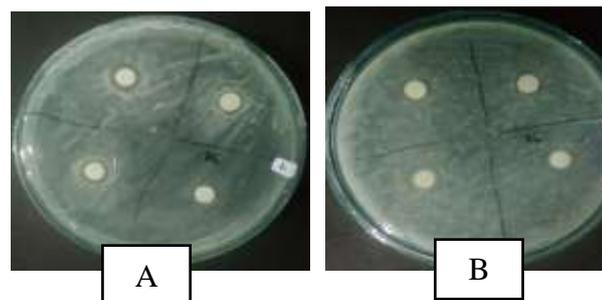
pula aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji yang digunakan. Zona penghambatan bakteriosin terhadap bakteri uji dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Zona penghambatan bakteriosin terhadap bakteri uji

Kode Isolat	Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata (mm)	Kategori
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	K- (Tanpa Bakteriosin)		
LT 3	<i>Bacillus subtilis</i>	2.56	2.60	1.42	0	2.19	Lemah
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.75	2.64	1.50	0	1.96	Lemah
LT 4	<i>Bacillus subtilis</i>	3.85	3.09	2.74	0	3.23	Lemah
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.97	2.37	3.16	0	3.16	Lemah
LT 5	<i>Bacillus subtilis</i>	8.62	2.52	4.78	0	5.30	Sedang
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.02	2.42	2.17	0	2.87	Lemah
LT 6	<i>Bacillus subtilis</i>	3.30	3.06	3.85	0	3.40	Lemah
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.48	2.70	3.58	0	2.92	Lemah

Hasil penelitian mengenai aktivitas hambat bakteriosin dari isolat LT 3, LT 4, LT 5 dan LT 6 menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan zona bening disekitar kertas cakram. Hal ini menunjukkan adanya respon penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat dari keseluruhan ekstrak bakteriosin masih dikategorikan lemah dengan zona penghambatan <5 mm. Namun, hasil rata-rata zona hambat dari isolat LT 5 terhadap bakteri *Bacillus subtilis* menunjukkan kategori sedang. Hal ini sesuai dengan pendapat Lingga dkk, (2016), yang mengatakan bahwa Kriteria aktivitas penghambatan dikatakan lemah bila diameter daerah bening yang terbentuk sekitar <5 mm. Aktivitas penghambatan dianggap sedang ketika diameter area yang terlihat adalah 5-10 mm.

Hasil rata-rata diameter zona penghambatan juga menunjukkan bahwa rata-rata aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Bacillus subtilis* memiliki daya hambat yang lebih besar dibandingkan dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini terjadi karena *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki struktur dinding sel yang berbeda, sehingga ekstrak bakteriosin memiliki kemampuan yang berbeda untuk menembus dinding sel untuk melakukan aktivitas penghambatan. Seperti yang dijelaskan oleh Hafsani (2014), strain bakteri Gram positif sangat rentan terhadap bakteriosin, sedangkan strain bakteri Gram negatif resisten terhadap bakteriosin. Hasil pengamatan daerah uji hambat bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Uji zona hambat, ekstrak bakteriosin dari isolat LT5 terhadap bakteri: A) *Bacillus subtilis* dan B) *Pseudomonas aeruginosa*

Perbedaan aktivitas penghambatan ekstrak bakteriosin terhadap *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* kemungkinan dikarenakan struktur dinding sel masing-masing berbeda. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang mengandung peptidoglikan tebal. Lapisan peptidoglikan terdiri dari jaringan dengan banyak pori-pori, memungkinkan masuknya molekul asing ke dalam sel. Berbeda seperti bakteri Gram-positif, bakteri Gram-negatif memiliki kandungan lipid yang lebih tebal. Kandungan lipid terdiri dari lipoprotein, lipopolisakarida, dan fosfolipid. Struktur bilayer tersebut menjadi suatu faktor utama yang menghalangi masuknya zat asing ke dalam dinding sel (Feng *et al.*, 2000).

Menurut Hafsan (2014), bakteri yang berasal dari bakteri asam laktat kurang efektif untuk mencegah pertumbuhan bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan membran terluarnya memiliki sifat hidrofilik, sehingga mampu menghambat aktivitas bakteri. Bakteri Gram-negatif mempunyai mekanisme selektif molekul asing di lapisan lipopolisakarida.

Kemampuan bakteriosin untuk menghambat spesies bakteri tergantung pada jenis dinding sel bakteri yang dihambat. Perbedaan dinding sel akan mempengaruhi resistensi bakteri terhadap senyawa antibakteri. Hal ini juga terkait dengan polaritasnya. Senyawa antibakteri dengan sifat nonpolar mampu melakukan reaksi dengan fosfolipid pada membran sel bakteri, sehingga menyebabkan sel mengalami lisis (Yulinery dan Nurhidayat, 2015). Menurut Prasetyo (2009), bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang merupakan lapisan yang relatif tebal pada membran plasma yang sensitif terhadap lisozim. Sedangkan bakteri gram negatif resisten terhadap serangan lisozim karena memiliki membran luar yang melindungi peptidoglikannya.

Menurut Yulinery dan Nurhidayat (2015), bakteriosin merupakan senyawa yang bersifat non polar. Hal tersebut mengakibatkan bakteriosin dapat bereaksi dengan membran sel bakteri Gram positif. Hal ini tersebut ditandai dengan adanya hasil pengukuran daerah penghambatan yang terlihat bahwa bakteri *Bacillus subtilis* memiliki rata-rata hambatan yang lebih besar daripada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri Gram positif memiliki sensitivitas lebih bervariasi dibandingkan bakteri Gram negatif.

Pernyataan tersebut didukung oleh Hutabarat dkk (2015), yang mengatakan bahwa *Bacillus cereus* memiliki sifat yang sensitif terhadap senyawa antibakteri

nonpolar, sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* lebih sensitif terhadap senyawa antibakteri yang bersifat polar. Kesensitifan tersebut disebabkan bakteri Gram positif memiliki komponen dasar penyusun dinding sel yakni peptidoglikan, yang mana salah satu penyusun peptidoglikan merupakan suatu asam amino D-alanin dengan sifat hidrofobik. Lisis pada sel dapat terjadi apabila senyawa antibakteri yang bersifat non-polar bereaksi dengan fosfolipid dari membran sel bakteri Gram positif. Sedangkan, menurut Chevalier *et al.* (2017), zona hambat bakteriosin dari bakteri asam laktat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dikategorikan lemah karena bakteri *P. aeruginosa* adalah bakteri Gram-negatif, yang memiliki membran luar dan diatur oleh protein β -barrel sehingga lebih kompleks mekanisme transport zatnya, akibatnya bakteri asam laktat tidak mampu menghambat bakteri tersebut.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa zona hambat terbesar didapatkan dari isolat LT5 yang merupakan genus *Lactobacillus* dibandingkan dengan isolat lainnya yang merupakan genus *Streptococcus*. Hal ini kemungkinan dikarenakan genus *Lactobacillus* memiliki nilai pH yang lebih rendah dibandingkan dengan genus *Streptococcus*, sehingga asam laktat yang dihasilkan jauh lebih tinggi dan menyebabkan daya hambat yang dihasilkan jauh lebih besar. Afriani dkk (2017), menyebutkan bahwa pH medium yang diinokulasi oleh *Lactobacillus plantarum* lebih rendah dibandingkan dengan pH medium yang diinokulasi oleh *Streptococcus thermophilus*. Sehingga menyebabkan asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* lebih tinggi dibandingkan dengan *Streptococcus thermophilus*. Akibatnya, isolat bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* memiliki daya hambat lebih besar. Menurut Usmiati dan Nur (2011), faktor yang

mempengaruhi aktivitas bakteriosin diantaranya adalah kondisi lingkungan, seperti pH dan suhu.

Adanya perbedaan kemampuan bakteriosin dalam menghambat bakteri kemungkinan juga disebabkan oleh jenis bakteri uji yang digunakan. Biasanya bakteriosin bersifat antibakteri terhadap bakteri yang spesifik. Hal ini sesuai dengan Usmiati *et al.* (2009), yang menyebutkan bahwa kemampuan bakteriosin dalam menghambat bakteri tergantung dari spesies bakteri penghasil bakteriosin dan jenis bakteri uji. Perbedaan aktivitas hambat dikarenakan bakteriosin mempunyai aktivitas hambat terhadap bakteri yang spesifik, dan biasanya mempunyai hubungan kekerabatan (filogenik) dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin tersebut. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan sistem klasifikasinya, bakteri *Bacillus subtilis* memiliki kesamaan dengan bakteri asam laktat pada tingkat kelas yaitu pada kelas *Bacilli*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan bakteri asam laktat dibandingkan dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Selain itu, perbedaan aktivitas hambatan juga disebabkan karena ekstrak bakteriosin yang digunakan. Menurut Sidabutar dkk (2015), aktivitas hambat bakteriosin dari fragmen bakteriosin (ekstrak murni) setelah pengendapan ammonium sulfat memiliki aktivitas hambat lebih besar dibandingkan dengan aktivitas hambat ekstrak bakteriosin tanpa pengendapan. Intensitas kejernihan zona hambat juga dapat dipengaruhi oleh kuantitas senyawa antibakteri yang diekskresikan. Menurut Raniningsih dkk (2021), kemampuan bakteriosin dalam

menghasilkan daya hambat tergantung dari konsentrasi bakteriosin dan jenis bakteri patogen. Semakin besar konsentrasi dari bakteriosin yang dihasilkan, maka semakin besar diameter zona hambatnya.

4.3 Tinjauan Al Qur'an mengenai Pemanfaatan Bakteriosin

Bakteriosin merupakan protein antibakteri yang disintesis secara ribosomal oleh berbagai spesies bakteri, termasuk bakteri asam laktat (Kusmarwati dkk, 2014). Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari berbagai medium, salah satunya adalah limbah cair tempe. Limbah tersebut merupakan produk sampingan dari industri pengolahan tempe yang umumnya tidak dimanfaatkan kembali, dan akan dibuang begitu saja, sehingga akan menimbulkan permasalahan lingkungan. Padahal air rendaman kedelai dalam limbah cair tempe memiliki kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang cukup tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan kembali, salah satunya sebagai penghasil bakteriosin.

Hal ini menunjukkan bahwa sesungguhnya tidak ada limbah, dalam artian sesuatu yang tidak bermanfaat. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semua ciptaan Allah memungkinkan untuk dapat digunakan kembali menjadi sesuatu yang bermanfaat apabila diketahui. Sebagaimana disebutkan dalam Al-Qur'an surah Ali Imron [3]: 190-191, yang berbunyi :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ ۱۹۰ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ
 اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا
 سُبْحَانَكَ قَوْلًا عَذَابَ النَّارِ ۱۹۱

Artinya : *“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang senantiasa mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi, (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan segala*

sesuatu ini dengan sia-sia”, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (Q.S. Ali Imron [3]: 190).

Berdasarkan tafsir Al-Qurthubi (2008), ayat 190-191 menjelaskan bahwa Allah *subhanahu wa ta'ala* telah memerintahkan manusia untuk selalu merenung, melihat dan berpikir akan adanya tanda-tanda kebesaran Allah. Karena sesungguhnya tanda atau bukti tersebut hanya ada karena diciptakan oleh Allah *subhanahu wa ta'ala*. Dengan meyakini hal tersebut, maka keimanan manusia didasarkan pada keyakinan yang benar. Lafadz “لَا إِلَهَ إِلَّا اللَّهُ” memiliki arti “*Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”. Hal ini menunjukkan bahwa salah satu fungsi akal yang diberikan Allah *subhanahu wa ta'ala* kepada seluruh umat manusia, yakni agar dapat menggunakannya untuk merenungi dan memikirkan tanda-tanda yang diberikan oleh Allah *subhanahu wa ta'ala* sehingga manusia mengetahui bahwa sesungguhnya tidak ada satupun dari ciptaan Allah yang diciptakan dengan sia-sia. Secara tidak langsung, dalam ayat tersebut terkandung “*mua'amalah minallah*”. Hal ini ditunjukkan dengan adanya tanda-tanda kekuasaan Allah yakni tentang penciptaan langit dan bumi, dimana dalam ayat tersebut dijelaskan bahwa seluruh ciptaan Allah, baik di langit maupun di bumi tidak ada yang sia-sia sehingga manusia perlu berpikir dan merenungkan segala ciptaan-Nya.

Penelitian ini memanfaatkan limbah cair tempe untuk melihat kandungan bakteri asam laktat didalamnya. Limbah cair tempe sendiri merupakan produk samping dari hasil produksi tempe yang umumnya dianggap tidak berguna lagi, sehingga akan dibuang begitu saja. Padahal limbah tersebut masih memiliki manfaat apabila diteliti kembali. Hal tersebut merupakan interpretasi dari lafadz

“ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا ” pada ayat 191 bahwa Allah *subhanahu wa ta'ala* tidak menciptakan segala sesuatu di langit dan di bumi tanpa ada manfaatnya. Seperti halnya limbah cair tempe yang apabila dimanfaatkan kembali dapat mengurangi adanya pencemaran lingkungan. Hal tersebut merupakan salah satu bentuk pandangan dari “*mua'amalah ma'a Alam*”, dimana diketahui bahwa pemanfaatan limbah cair tempe dalam penelitian dapat memberikan dampak positif bagi lingkungan yakni mengurangi adanya pencemaran lingkungan.

Limbah cair tempe dapat menimbulkan masalah dalam penanganannya karena mengandung sejumlah besar karbohidrat, protein, lemak, garam-garam, mineral, dan sisa-sisa bahan kimia yang digunakan dalam proses pengolahannya. Limbah cair tempe umumnya memang ditampung dalam *septic tank* yang telah dibuat oleh produsen tempe, namun tidak dapat dipungkiri bahwa limbah tersebut masih dibuang ke perairan disekitarnya. Apabila limbah tersebut dibuang langsung ke suatu perairan, dapat menyebabkan terganggunya seluruh keseimbangan ekologi, juga dapat menyebabkan kematian ikan dan biota perairan lainnya. Sehingga adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan limbah ini sangat diperlukan untuk mengurangi masalah pencemaran lingkungan, juga dapat dimanfaatkan untuk melakukan uji adanya bakteri asam laktat yang nantinya dapat digunakan sebagai penghasil bakteriosin.

Penggunaan bakteriosin di masa depan dapat digunakan sebagai penambah cita rasa pada makanan serta sebagai sarana untuk mengidentifikasi dan menghilangkan patogen dalam makanan. Patrovsky dkk. (2016) menegaskan bahwa bakteriosin memiliki sifat yang bermanfaat sebagai agen antibakteri. Bakteriosin yang berasal dari bahan alam bersifat tidak beracun, dan mudah

didegradasi oleh enzim pencernaan. Penggunaan bakteriosin tidak mengakibatkan perubahan rasa dan bau makanan. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa bakteriosin perlu dikembangkan lebih lanjut sebelum dapat digunakan sebagai pengawet pada produk pangan.

Bakteriosin sering digunakan sebagai agen biopreservatif pangan. Hal tersebut karena bakteriosin mampu mencegah terjadinya pembusukan pada makanan dengan cara menekan pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri penyebab pembusukan (Nurraifah dkk., 2021). Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL sangat bermanfaat jika diaplikasikan dalam industri makanan. Hal ini dikarenakan bakteriosin memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menekan pertumbuhan bakteri kontaminan yang dapat menyebabkan pembusukan makanan dan bakteri penyebab penyakit bawaan makanan (*foodborne disease*). Biopreservatif ini juga diharapkan dapat mengurangi bahkan menggantikan penggunaan pengawet sintetis yang dapat menimbulkan berbagai penyakit (Hafsan, 2014).

Penggunaan bakteriosin dalam makanan merupakan bentuk “*mua’alah ma’a an-Naas*”. Bakteriosin dapat dikatakan memiliki manfaat yang besar bagi manusia karena dapat meningkatkan kualitas dan keamanan produk makanan, karena mampu mencegah pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk pada makanan. Sehingga makanan yang dikonsumsi manusia merupakan makanan yang baik dan tidak membahayakan tubuh. Hal ini sesuai dengan firman Allah *subhanahu wa ta’ala* dalam Al Qur’an yakni dalam Qur’an Surah Al Baqarah ayat 168, yaitu:

يَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُبِينٌ
(١٦٨)

Artinya: “*Hai sekalian manusia, makanlah makanan 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.*” (QS. Al Baqarah [2]: 168).

Menurut tafsir Jalalain (2008), *يَأَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا* (*Hai sekalian manusia, makanlah yang halal dari apa-apa yang terdapat di muka bumi*) halal menjadi "hal", *طَيِّبًا* (*lagi baik*) merupakan sifat yang memperkuat, yang berarti enak atau lezat, *وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوتَ* (*dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah*) atau jalan-jalan, *الشَّيْطَانِ* (*setan*) dan rayuannya. *إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ* (*sesungguhnya ia menjadi musuh yang nyata bagimu*) artinya jelas dan terang permusuhannya itu.

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2005), menjelaskan bahwa setelah Allah *subhanahu wata'ala* menjelaskan bahwa tidak ada Tuhan selain Allah dan hanya Allah yang menciptakan segala sesuatu, maka Allah *subhanahu wata'ala* menjelaskan bahwa Dialah yang memberikan rezeki kepada seluruh makhluk-Nya. Allah *subhanahu wata'ala* sebagai pemberi rezeki, menyatakan bahwa Dia mengizinkan manusia untuk makan dari segala sesuatu di bumi, yaitu apa yang halal bagi mereka, dan juga baik dan tidak berbahaya bagi tubuh dan pikiran. Allah *subhanahu wata'ala* melarang umat manusia untuk mengikuti langkah-langkah setan yang menyesatkan, seperti melarang *bahirah*, *washilah* dan lain-lain yang setan tanamkan pada manusia pada zaman jahiliyah.

Sebagaimana yang disebutkan didalam hadits Hasan yang diriwayatkan Ibnu Majah, Ad-Daraquthni, bahwa Rasulullah *Shallallahu 'alaihi wasallam* pernah bersabda:

عَنْ أَبِي سَعِيدٍ سَعْدِ بْنِ سِنَانَ الْخُدْرِيِّ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ أَنَّ رَسُولَ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ: لَا ضَرَرَ وَلَا ضِرَارَ

Artinya: “Dari Abu Sa’id Sa’ad bin Malik bin Sinan Al-Khudri radhiyallahu ‘anhu, bahwa Rasulullah Shallallahu ‘alaihi wasallam bersabda, “Tidak boleh membahayakan diri sendiri dan tidak boleh membahayakan orang lain”. (HR. Ibnu Majah No. 2431).

Ayat dan hadits tersebut menjelaskan bahwa Allah *subhanahu wata’ala*, telah memerintahkan manusia untuk memakan makanan yang halal dan baik bagi kesehatan, sehingga tidak membahayakan tubuh. Allah *subhanahu wata’ala* juga memerintahkan untuk berhati-hati dalam memilih makanan. Dengan tidak mengikuti langkah-langkah setan, yang dalam hal ini termasuk juga hawa nafsu. Seseorang yang cenderung lalai dan mengikuti hawa nafsu, terkadang mengikuti pola hidup konsumtif yang mudah dan enak dirasakan, termasuk juga dalam memilih makanan. Bahkan tanpa memikirkan efek buruk yang mungkin akan muncul dari pola hidup tersebut. Sehingga tanpa disadari, makanan lezat yang dikonsumsi justru akan merusak jasmani karena memiliki komposisi yang tidak sesuai dengan nilai yang ditentukan atas dasar kriteria keamanan makanan. Salah satu pemicu timbulnya penyakit akibat makanan yang dikonsumsi adalah adanya kontaminasi dalam makanan oleh berbagai macam bakteri.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tempe didapatkan 4 isolat yang selanjutnya dilakukan pengamatan dan karakterisasi secara makroskopis maupun mikroskopis. Dua isolat diperkirakan sebagai genus *Lactobacillus*, sedangkan dua lainnya diperkirakan sebagai genus *Streptococcus*.
2. Bakteri asam laktat dari 4 isolat setelah dilakukan produksi bakteriosin dan uji aktivitas antibakteri dari bakteriosin didapatkan bahwa keseluruhan isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan zona hambat yang berbeda. Diameter zona hambat terbesar terdapat pada isolat LT5 yang merupakan genus *Lactobacillus* dengan kategori sedang.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disarankan beberapa hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan tingkat molekuler dari 4 isolat.
2. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap bakteriosin yang dihasilkan oleh 4 isolat yaitu pemurnian dan karakterisasi bakteriosin.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Noni, Yusmarini dan Usman Pato. 2017. Aktivitas Antimikroba *Lactobacillus plantarum* 1 Yang Diisolasi Dari Industri Pengolahan Pati Sagu Terhadap Bakteri Patogen *Escherichia Coli* FNCC-19 Dan *Staphylococcus aureus* FNCC-15. *JOM FAPERTA*. 4(2).
- Al Mahali, Imam Jalalain. 2008. *Tafsir Jalalain Berikut Asbabun Nuzul Jilid 1*. Sinar Baru Algensindo. Juz 4. Hal 287.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi jilid 8, Terj. Budi Rosyadi dkk*. Jakarta: Pustaka Azzam. Hal. 865-867.
- Alvarez-Sieiro, Patricia, Manuel Montalbán-López, Dongdong Mu dan Oscar P. Kuipers. 2016. Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria: Extending The Family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100:2939–2951.
- Amaliah, Zakiyah Zahra Nur, Saiful Bahri, dan Puteri Amelia. 2018. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *Jurnal Farmasi*. 5(1): 253-257.
- Andiani, Winarsih. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kerbau Asal Kabupaten Enrekang. *Skripsi*. Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan. UIN Alauddin Makassar.
- Aritonang, S. N., Roza, E., Rossi, E., Purwati, E., & Husmaini, H. 2017. Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria From Okara And Evaluation Of Their Potential As Candidate Probiotics. *Pakistan Journal Nutrition*. 16(8): 618-628.
- Arvina, Fakrurrazi, Mahdi Abrar, Farida Athaillah, Rastina dan M. Nur Salim. 2017. Isolasi Bakteri *Pseudomonas* sp Pada Ikan Asin Talang- Talang (*Scomberoides tala*) Di Desa Puloet Kecamatan Leupung Kabupaten Aceh Besar. *JIMVET*. 01(3): 547-551.
- Ayivi, Raphael D., Rabin Gyawali, Albert Krastanov, Sulaiman O. Aljaloud, Mulumebet Worku, Reza Tahergorabi, Roberta Claro da Silva and Salam A. Ibrahim. 2020. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*. 1:202-232.
- Barus, Tati., Dika Putri Salim, dan Anastasia Tatik Hartanti. 2019. Kualitas Tempe menggunakan *Rhizopus delemar* TB 26 dan *R. delemar* TB 37 yang Diisolasi dari Inokulum Tradisional Tempe "daun waru". *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 8(4): 143-148.
- Bella, Dona. 2016. Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Air Penggumpal Tahu Alami. *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Kristen Satya Wacana Salatiga.

- Bintsis, Thomas. 2018. Lactic Acid Bacteria As Starter Cultures: An Update In Their Metabolism and Genetics. *AIMS Microbiology*. 4(4): 665-684.
- Chevalier, S., E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilleley, N. Orange, A. Dufour dan P. Cornelis. 2017. Structure, Function and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Porins. *FEMS Microbiology Reviews*. 41 (5) : 698– 722. ISSN-0126-4400.
- Cho, Young-Hee, Sung-Moon Hong, and Cheol-Hyun Kim. 2013. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Kimchi, Korean Traditional Fermented Food to Apply into Fermented Dairy Products. *Korean J. Food Sci. An*. 33(1): 75-82.
- Dewi, Lulu Fatma, Sartini, dan Rahmiati. 2019. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Sapi (*Bos taurus*) serta Kemampuannya dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella* sp. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA*. 1(1): 21-27.
- Dharmayanti, I Gusti Ayu Mas Putri dan Dewa Made Sukrama. 2019. Karakteristik Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan Pola Kepekaannya Terhadap Antibiotik Di Intensive Care Unit (Icu) RSUP Sanglah pada Bulan November 2014 – Januari 2015. *E-JURNAL MEDIKA*. 8(4): 2303-1395.
- Djaenuddin, Nurasiah dan Amran Muis. 2015. Karakteristik Bakteri Antagonis *Bacillus subtilis* dan Potensinya Sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Tanaman. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. 489-494.
- Effendi, Ferry, Anna P. Roswien dan Ernie Stefani. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Teh Kombucha Probiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Journals of Pakuan University*.
- Fauzi, Mukhammad, Setiadji, dan Megawati. 2012. Produksi Ragi Kopi Kultur Tunggal: *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. paramesenteroides* Dari Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Kopi Luwak. *AGROTEK*.6(1): 59-69.
- Fauziah, P. N., Jetty Nurhajati, Chrysanti. 2013. Pengaruh Laju Pertumbuhan dan Waktu Generasi Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Koloni *Klebsiella pneumoniae* Strain ATCC 700603, CT1538 dan S941 Oleh *Lactobacillus bulgaricus* KS1 Dalam Soyghurt.
- Fatimah, Meliana Puti, Imam Megantara dan Trianing Tyas Kusuma Anggaeni. 2020. Kajian Pustaka: Pemanfaatan Bakteriosin dari Produk Fermentasi sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Indonesia Medicus Veterinus*. 9(5): 835-848.
- Fatisa, Y. 2013. Daya Antibakteri Estrak Kulit Dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium mutabile*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*. 10(1).

- Feng, Q.L., J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, & J.O. Kim. 2000. A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. John Wiley & Sons, Inc.
- Gálvez, Antonio, Hikmate Abriouel, Rosario Lucas López, Nabil Ben Omar. 2007. Bacteriocin-Based Strategies For Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120: 51–70.
- Hafsan, Hafsan. 2014. Bakteriosin Asal Bakteri Asam Laktat Sebagai Biopreservatif Pangan. *Jurnal Teknosains*. 8(2): 175-184.
- Handayani, Novarina Irnaning, Misbachul Moenir, Nanik Indah Setianingsih, dan Rizal Awaludin Malik. 2016. Isolasi Bakteri Heterotrofik Anaerobik pada Pengolahan Air Limbah Industri Tekstil. *Jurnal Riset Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri*. 7(1):39-46.
- Harianie, Liliek. 2013. Produksi Bakteriosin Oleh *Lactobacillus plantarum* DJ3 dan Aplikasinya Sebagai Pengawet Daging. *El-Hayah*. 4(1): 17-25.
- Hidayat, Nur, Irene Meitiniarti, Siswa Setyahadi, Usman Pato, Evi Susanti, Madiana C. Padaga, Agustin Krisna Wardani, Umi Purwandari. 2018. *Mikrobiologi industri pertanian*. Malang : UB Press.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Peter, H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth edition*. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland. USA.
- Hutkins, Z.H. 2006. *Microbiology and Technology Of Fermented Foods*. Australia: Blackwell Publishing Asia.
- Holderman, Michelle V., Edwin de Queljoe, dan Sendy B. Rondonuwu. 2017. Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator Di Salah Satu Pusat Perbelanjaan di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains*. 17(1): 13-18.
- Hutabarat, M. Aziz Amin, N. Ira Sari dan Tjipto Leksono. 2015. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
- Jati, Anis Usfah Prastu. 2012. Produksi Bakteriosin Kasar *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1A5, 1B1 dan 2B2 Asal Daging Sapi Serta Aktivitas Antimikrobanya terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi XXII*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Kasi, Pauline Destinugrainy, Ariandi, dan Heni Mutmainnah. 2017. Uji Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Limbah Cair Sagu terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Biotropika*. 5(3): 97-101.
- Katsir, Min Ibn. 2005. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 1*. Jakarta: Team Pustaka Imam Asy-Syafi'i. Hal. 319.

- Khaira, Evelyn dan Chairul. 2019. Inaktivasi Termal Spora *Bacillus subtilis* Dalam Jus Nanas. *Jom FTEKNIK*. 6(2): 1-8.
- Khalid, K. 2011. An Overview Of Lactic Acid Bacteria. *International Journal Of Biosciences (IJB)*. 1(30): 1-13.
- Khoiria, Isti Rozatul. 2008. Pemanfaatan Limbah Cair Air Rendaman Kedelai Tempe Sebagai Pupuk Organik Cair Pada Kangkung Darat. *Karya Tulis Ilmiah*. Jurusan Kesehatan Lingkungan. Politeknik Kesehatan Depkes Yogyakarta. Yogyakarta.
- Kurnia, Moga, Hermansyah Amir dan Dewi Handayani. 2020. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Makanan Tradisional Suku Rejang Di Provinsi Bengkulu: "Lemea". *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 4(1): 25-32.
- Kusmarwati, Arifah., Fadila Rachman Arief, dan Sakinah Haryati. 2014. Eksplorasi Bakteriosin Dari Bakteri Asam Laktat Asal Rusip Bangka Dan Kalimantan. *JPB Perikanan*. 9(1): 29-40.
- Laily, Ikrimah Nur, Rohula Utami, dan Esti Widowati. 2013. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin Dari Produk Fermentasi Sawi Asin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2(4): 179-184.
- Lingga, Ancela Rabekka, Usman Pato dan Evy Rossi. 2015. Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. 2016. *JOM Faperta*. 2(2).
- Meziane, M., Dilmi Bouras A., El Hameur H., Boukrabouza S. dan Bensehaila S. 2011. Lactic Acid and Hydrogen Peroxide Production By Free and Immobilization Cells Of Two *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* In A Sugar Molasses Medium. *African Journal of Biotechnology*. 10 (74): 16953-16962.
- Megasari, Ritni, Danang Biyatmoko, Wahyuni Ilham, Jamzuri Hadie. 2012. Identifikasi Keragaman Jenis Bakteri Pada Proses Pengolahan Limbah Cair Industri Minuman Dengan Lumpur Aktif Limbah Tahu. *EnviroScientiae*. 8: 89-101.
- Moreno-Arribas, M. Victoria, and M. Carmen Polo. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. France: Springer.
- Ndahawali, Daniel H. 2016. Mikroorganisme Penyebab Kerusakan Pada Ikan dan Hasil Perikanan Lainnya. *Buletin Matric*. 13(2): 17-21.
- Novidar, Rizka, Rastina dan Razali. 2018. Perbedaan Lama Penyimpanan Telur Itik Asin Mentah Terhadap Jumlah *Pseudomonas* sp. *JIMVET*. 2(3): 311-317.

- Nurraifah, Y., I. I. Arief, dan N. Ulupi. 2021. Penggunaan Bakteriosin yang Diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* sebagai Pengawet Alami untuk Daging Ayam yang Disimpan di Suhu Ruang. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 9(1): 7-14.
- Nurhasanah dan Pramudyanto, B. B. 1991. Penanganan Air Limbah Tahu. Jakarta: Yayasan Bina Karya Lestari.
- Nurhayati, Lilih Siti, Nadhira Yahdiyani dan Akhmad Hidayatulloh. 2020. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*. 1(2):41-46.
- Ogunbawo, S. T., A. I. Sarni & A. A. Onilude. 2003. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afric. Journal Biotechnol.* 2(8):. 210-227.
- Okfrianti, Yenni, Darwis, dan Ayu Pravita. 2018. Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* C410LI dan *Lactobacillus rossiae* LS6 yang Diisolasi dari Lemea Rejang terhadap Suhu, pH dan Garam Empedu Berpotensi sebagai Prebiotik. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kesehatan*. 6(1). 2338-9109.
- Patrovský, Matěj, Lenka Kouřimská, Šárka Havlíková, Jaroslava Marková, Radko Pechar and Vojtěch Rada. 2016. Utilization Of Bacteriocin-Producing Bacteria In Dairy Products. *Mljekarstvo*. 66 (3): 215-224.
- Pisol, Balqis., Lilis Nuraida, Noriham Abdullah, Suliantari and Khalilah Abdul Khalil. 2013. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Soybean Tempe. *International Conference on Biology, Environment and Chemistry*. 58 (7): 32-36.
- Prabowo, Ivy Dian Puspitasari, Simon Bambang Widjanarko, Sudarminto Setyo Yuwono. 2018. Pengaruh Metode Perendaman Kedelai (*Glycine max*) Terhadap Karakteristik Pektin. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 19(2): 117-124.
- Prasetyo, Tomie. 2009. Pola Resistensi Bakteri dalam Darah terhadap Kloramfenikol, Trimethoprim/Sulfametoksazol, dan Tetrasiklin di Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (LMK FKUI) pada tahun 2001-2006. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Pratita, Maria Yuli Endah dan Surya Rosa Putra. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Dari Sumber Mata Air Panas Di Songgoriti Setelah Dua Hari Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1): 1-5.
- Purnama, Sang Gede. 2016. Modul Analisis Dampak Limbah Cair Industri Tempe di Denpasar. Program Studi Kesehatan Masyarakat. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Bali.

- Purnamasari, Hestiarahma. 2015. Kemukus (*Piper cubeba* L.) Sebagai Antibakteri Terhadap Sel Vegetatif dan Spora *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*. Fakultas Biologi Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Purwaningsih Desi dan Destik Wulandari. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains Kesehatan*. 3(5): 2303-0267.
- Putri, Yessi Widya, Andani Eka Putra, dan Bobby Indra Utama. 2018. Identifikasi Dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Vagina Wanita Usia Subur. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 7(3): 20-25.
- Putri, Adde Lolita Octavia dan Endang Kusdiyantini. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Pangan Fermentasi Berbasis Ikan (Inasua) Yang Diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*. 1(2): 6-12.
- Rachmawati, Intan, Suranto, Ratna Setyaningsih. 2005. Uji Antibakteri Bakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen. *Bioteknologi*. 2 (2): 43-48.
- Rahayu, Endang. S. dan S. Margino. 1992. *Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Rahayu, Winiati P., Rindit Pambayun, Umar Santoso, Lilis Nuraida dan Ardiansyah. 2015. *Tinjauan Ilmiah Teknologi Pengolahan Tempe Kedelai*. Jakarta: Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI).
- Rahmadi, Anton. 2018. *Bakteri Asam Laktat dan Mandai Cempedak*. Samarinda: Mulawarman University Press.
- Raningsih, Ni Made, Nadya Treesna Wulansari, dan Ni Komang Suarnadi. 2021. Efektivitas Bakteriosin *Streptococcus thermophilus* Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *BIO-EDU: Jurnal Pendidikan Biologi*. 6(2): 83-89.
- Razak, A.R, Patong, A.R, Harlim, T., Djide, M.N., Haslia dan Mahdalia. 2009. Produksi Senyawa Bakteriosin Secara Fermentasi menggunakan isolat BAL Enterrococcus faecium DU55 dari Dangke. *J.Indonesia Chemica Acta*. 2 (2): 2085-014X.
- Rini, Chylen Setiyo dan Jamilatur Rohmah. 2020. *Bakteriologi Dasar*. Sidoarjo: Umsida Press.
- Rorong, Johnly Alfreds dan Wiesje Fenny Wilar. 2020. Keracunan Makanan Oleh Mikroba. *Techno Science Journal*. 2(2): 47-60.
- Safitri, Nurlaela, Titi Candra Sunarti, dan Anja Meryandini. 2016. Formula Media Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *Pediococcus pentosaceus*

- Menggunakan Substrat *Whey* Tahu. *Jurnal Sumberdaya Hayati*. 2(2):31-38.
- Sanjaya, I G. A. Ngurah Aswin Panji, Ni Nengah Dwi Fatmawati dan Made Agus Hendrayana. 2019. Prevalensi Isolat Klinis *Pseudomonas aeruginosa* Yang Memiliki Gen *lasI* dan *lasR* Di Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar Tahun 2013 – 2016. *E-JURNAL MEDIKA*. 8(6): 2597-8012.
- Sari, Rohmah Anita, Risa Nofiani, dan Puji Ardiningsih. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Genus *Leuconostoc* Dari Pekasam Ale-Ale Hasil Formulasi Skala Laboratorium. *JKK*. 1 (1):14-20.
- Sidabutar, Anita R., Feliatra dan Andi Dahliaty. 2015. Uji Aktivitas Antimikroba Bakteriosin Dari Bakteri Probiotik Yang Diisolasi Dari Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus). *University of Riau, Pekanbaru Journal*.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A. and Pereira, M. O. 2013. Improvements On Colony Morphology Identification Towards Bacterial Profiling. *Journal Of Microbiological Methods*. 95: 327-335.
- Suardana, I Wayan, Hendro Sukoco, dan Nyoman Semadi Antara. 2018. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 18A Secara Fenotipik. *Buletin Veteriner Udayana*. 10(1): 1-9.
- Suardana, I Wayan, Ni Made Ayu Aryati Dinarini, dan I Dewa Made Sukrama. 2021. Identifikasi Spesies Streptokokus β -Hemolisis Hasil Isolasi dari Nasal dan Tonsil Babi dengan Uji Basitrasin. *Buletin Veteriner Udayana*. 13(1): 27-33.
- Suardiyono, Farikha Maharani dan Harianingsih. 2019. Pembuatan Pupuk Organik Cair Dari Air Rebusan Olahan Kedelai Menggunakan Effective Mikroorganisme. *Inovasi Teknik Kimia*. 4(2): 44-48.
- Sulistiani, Sulistiani. 2017. Senyawa Antibakteri yang Diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* dan Aplikasinya untuk Pengawetan Bahan Ikan. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(2): 233-240.
- Sulmiyati, Nur Saidah Said, Deka Uli Fahrodi, Ratmawati Malaka dan Fatma Maruddin. 2018. The Characteristics Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Indonesian Commercial Kefir Grain. *Malaysian Journal of Microbiology*. 4(7): 632-639
- Sumual, Acika M., Fatimawali¹, dan Trina E. Tallei. 2019. Uji Antibakteri Dari Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Selada Romain (*Lactuca sativa* var. *longifolia* Lam.). *PHARMACON*. 8(2):306-314.
- Supriadi, Bambang dan Lailatul Nuraini. 2019. *Fisika Atom: Teori dan Aplikasinya*. Jember: UPT Percetakan & Penerbitan Universitas Jember.
- Surbakti, Febry Harissa dan Uswatun Hasanah. 2019. Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Acar Ketimun (*Cucumis sativus*

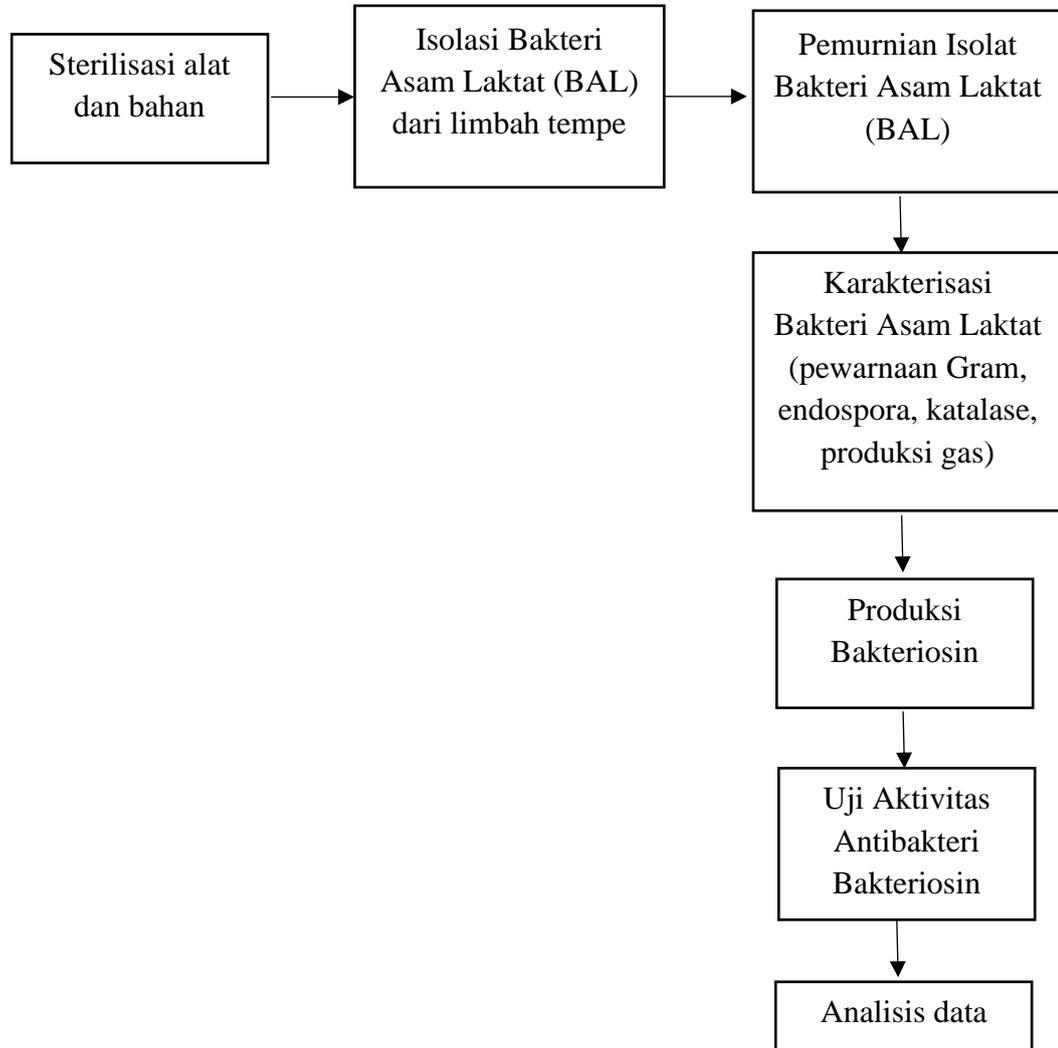
- L.) Sebagai Agensi Probiotik. *Jurnal Teknologi Pangan dan Kesehatan*. 1(1): 31-37.
- Surono, I. S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta.: Tri Cipta Karya.
- Suryani. 2020. *VIRGIN COCONUT OIL: Bakteri Asam Laktat dan Bakteriosin*. Sumatera Barat: Unitomo Press.
- Suskovic, Jagoda., Blazenka Kos, Jasna Beganovic, Andreja Lebos Pavunc, Ksenija Habjanic and Srecko Matosic. 2010. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3): 296–307.
- Sutrisno, K. 1992. *Teknologi Pengolahan Kedelai*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Suwayvia, Nadya. 2017. Produksi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 Sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan PH. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Suwito, Widodo. 2010. Bakteri Yang Sering Mencemari Susu: Deteksi, Patogenesis, Epidemiologi, dan Cara Pengendaliannya. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29(3): 96-100.
- Toelle, N. N and Viktor L. 2014. Identification And Characteristics Of *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus* sp. Infection Of Ovary In Commercial Layers. *Jurnal Ilmu Ternak*. 1(7): 32-37.
- Toldra, Fidel. 2007. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. France: Bllackwell Publishing.
- Usmiati, S., Miskiyah. dan Rarah, R. A. M. 2009. Pengaruh Penggunaan Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. Galur SCG 1223 Terhadap Kualitas Mikrobiologi Daging Sapi Segar. Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Usmiati, Sri dan Nur Richana. 2011. Potensi Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. Galur SCG 1223 Sebagai Biopreservatif pada Daging Segar. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. 7(2): 66-77.
- Utama, Cahya Setya, Zuprizal, Chusnul Hanim dan Wihandoyo. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Selulolitik yang Berasal dari Jus Kubis Terfermentasi. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 7 (1): 1-6.
- Vos, P., Garrity M. G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey A., Scler H., Karl Witman W. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteria Second Edition*. London: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Wardhani, Adeline Kusuma, Jacob L.A.Uktolseja dan Djohan. 2020. Identifikasi Morfologi Dan Pertuqurmbuhan Bakteri pada Cairan Terfermentasi

Silase Pakan Ikan. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek*. 2527-533X.

- Widowati, Imas., Siti Efiyati, dan Sari Wahyuningtyas. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Bakteri Pembusuk Ikan Segar (*Pseudoonas aeruginosa*). *PELITA*. 9(1): 146-157.
- Wikandari, Prima Retno, Suparmo, Yustinus Marsono dan Endang Sutriswati Rahayu. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik pada Bekasam. *Jurnal Natur Indonesia*. 14(2): 120-125.
- Wohlgemuth, S & Kampfer, P. 2014. *Bacteria: Bacterial Endospores. Encyclopedia Of Food Microbiology: Second Edition*. 1: 160-168.
- Yang, En., Lihua Fan, Yueming Jiang, Craig Doucette dan Sherry Fillmore. 2012. Antimicrobial Activity Of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheeses and Yogurts. *AMB Express A Springer Open Journal*. 2(48): 1-12.
- Yang, Shih-Chun, Chih-Hung Lin, Calvin T. Sung dan Jia-You Fang. 2014. Antibacterial Activity of Bacteriocins: Application in Foods and Pharmaceutials. *Fronties in Microbiology*. 5(241): 1-10.
- Yanti, Dwi Indah Widya dan Faiza Abdurrahim Dali. 2013. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Selama Fermentasi Bakasang. *JPHPI*. 16(2): 133-141.
- Yulinery, Titin dan Novik Nurhidayat. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri *Lactobacillus plantarum* Terseleksi Dari Buah Markisa (*Passiflora edulis*) Dan Kaitannya Dengan Gen plantarisin A (Pln A). *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 1(2): 270-277.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram alir penelitian



Lampiran 2. Dokumentasi penelitian

Foto	Keterangan
	<p>Sampel limbah tempe dari salah satu pabrik tempe di Sanan.</p>
 	<p>Pembuatan media MRSA + CaCO₃ 1%. Ditimbang media MRSA sebanyak 6.82 gr dan CaCO₃ 0.2 gr, lalu ditambahkan dengan akuades sebanyak 100 ml. Kemudian dipanaskan menggunakan <i>hot plate</i> sampai homogen dan disterilisasikan menggunakan autoklaf.</p>
	<p>Media MRSA + CaCO₃ 1%.</p>

	<p>Pembuatan media MRSB. Ditimbang media MRSB sebanyak 5.51 gr, lalu ditambahkan dengan akuades sebanyak 100 ml. Kemudian dipanaskan menggunakan <i>hot plate</i> sampai homogen dan disterilisasikan menggunakan autoklaf.</p>
	<p>Media MRSB.</p>
	<p>Pengenceran Bertingkat 10^{-1} sampai dengan 10^{-7}. Tabung reaksi di isi dengan 9ml NaCl 0,85% dan 1 ml sampel.</p>

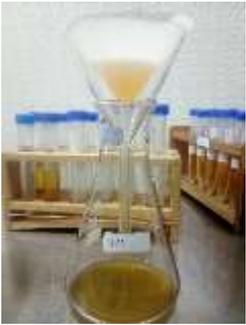


Diambil 3 seri pengenceran terakhir sebanyak 1ml, dipipet ke cawan petri secara duplo.

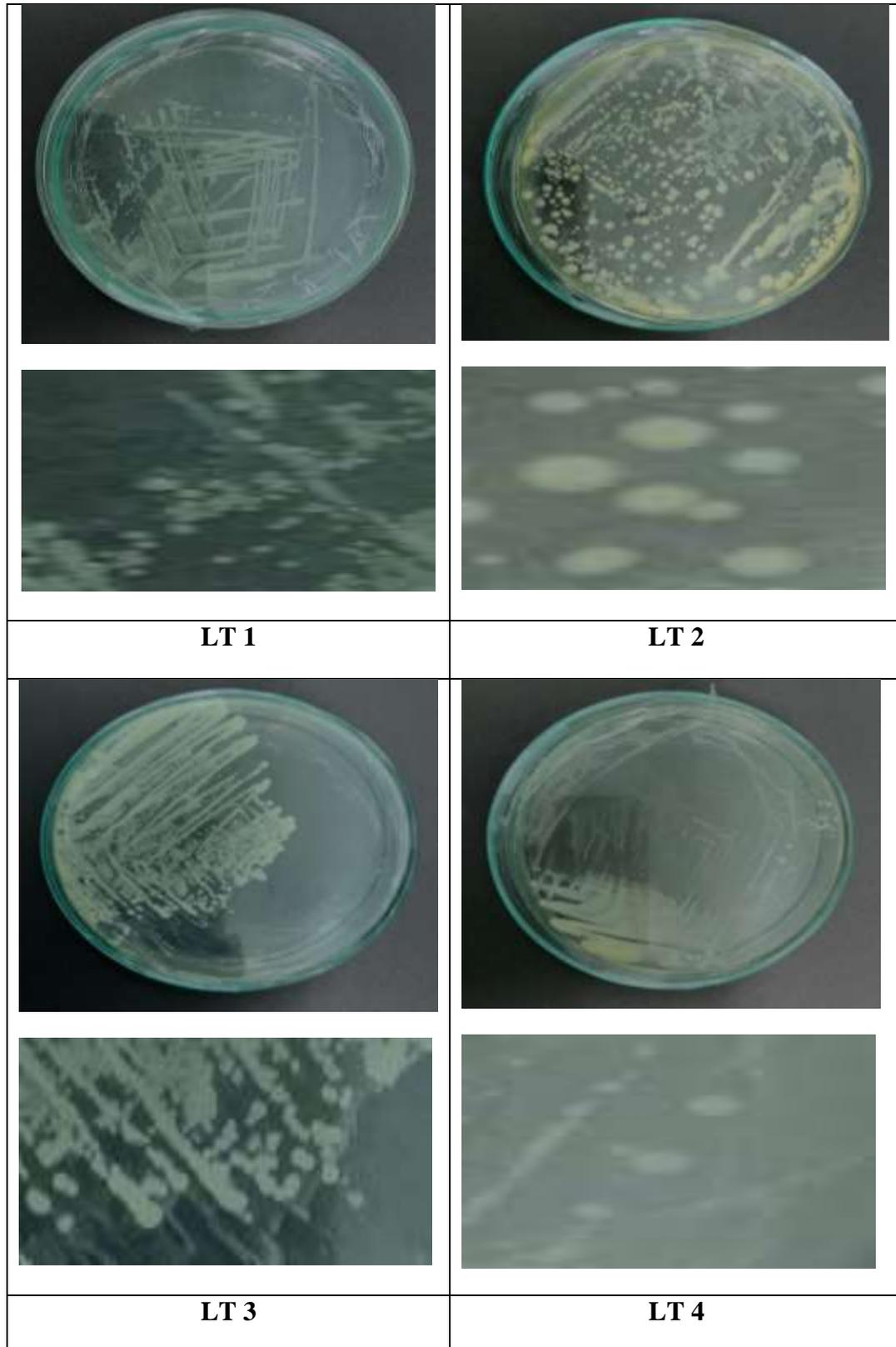


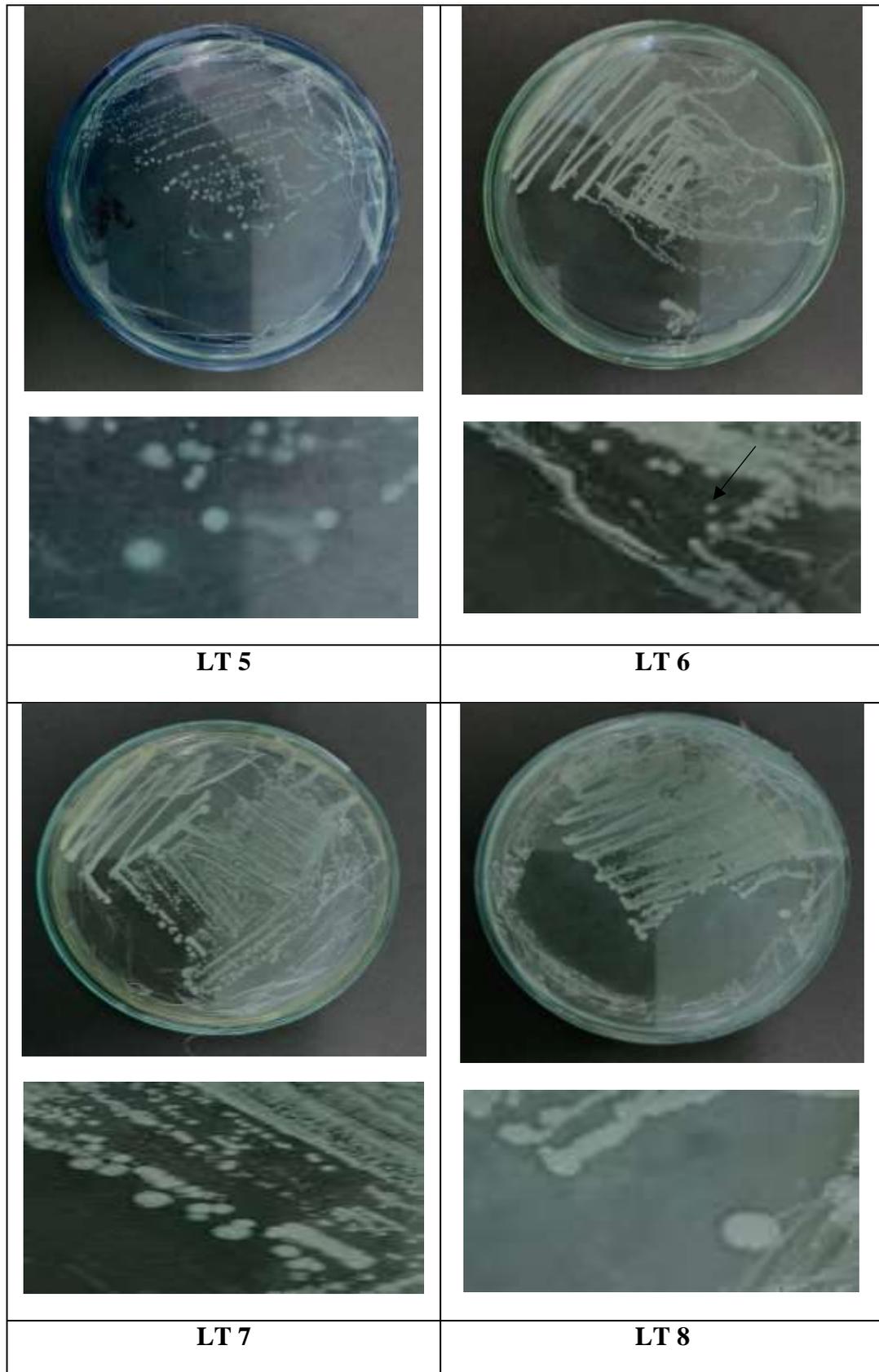
Pemurnian Isolat BAL

	<p>Kakterisasi isolat BAL, meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji katalase dan uji tipe fermentasi.</p>
	<p>Inokulum BAL setelah difermentasi (Produksi bakteriosin).</p>
	<p>Ekstrak bakteriosin sebelum disentrifuge.</p>

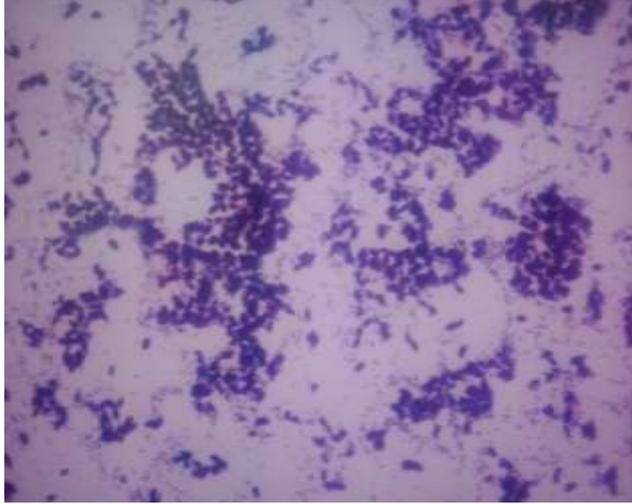
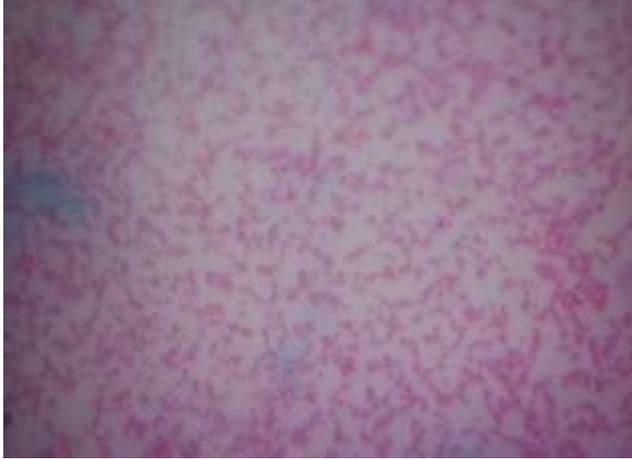
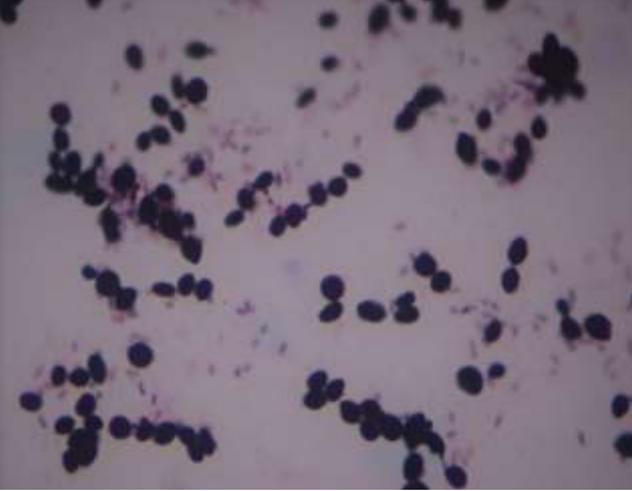
	Sentrifugasi ekstrak bakteriosin.
	Ekstrak bakteriosin setelah disentrifuge.
	Penyaringan ekstrak bakteriosin.
	Ekstrak kasar bakteriosin.

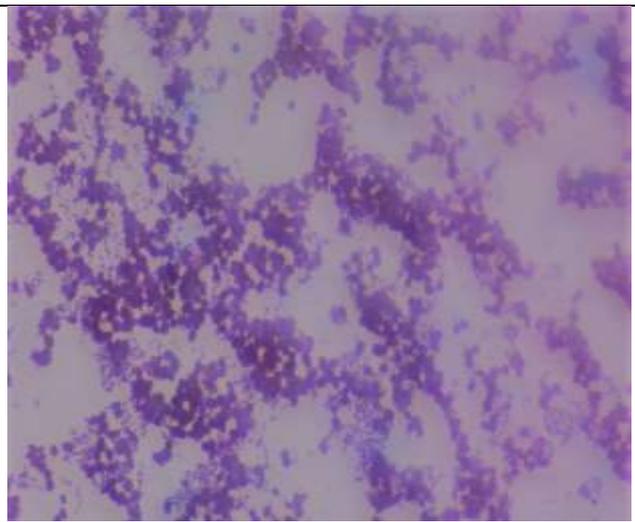
	<p>Penetralan ekstrak bakteriosin dari pH awal sekitar 4 hingga pH 7.</p>
	<p>Inokulum bakteri uji.</p>
	<p>Uji aktivitas bakteriosin terhadap bakteri uji.</p>

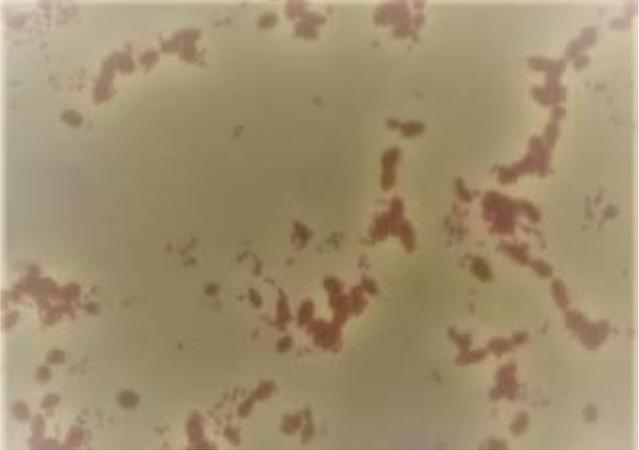
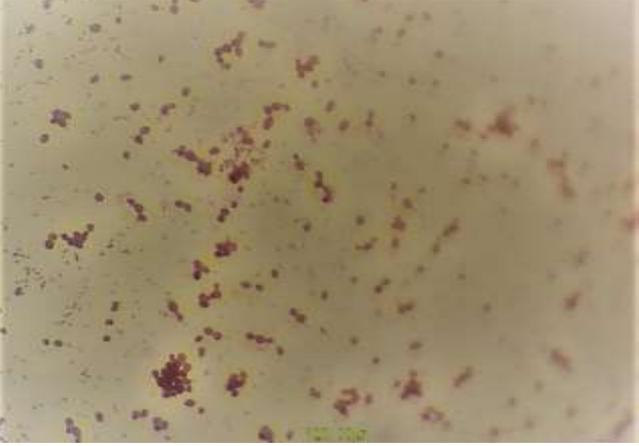
Lampiran 3. Hasil karakteristik Bakteri Asam Laktat dari Limbah Tempe**3.1 Pengamatan makroskopik koloni bakteri**



3.2 Pewarnaan Gram

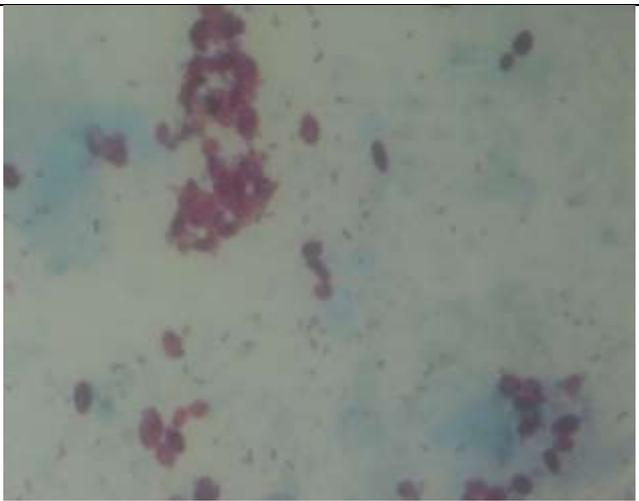
Kode Sampel	Foto Hasil Pengamatan	Keterangan
LT 1		1. Pewarnaan Gram= Gram positif 2. Bentuk sel= bulat PERBESARAN 1000X
LT 2		1. Pewarnaan Gram= Gram negatif 2. Bentuk sel= bulat PERBESARAN 1000X
LT 3		1. Pewarnaan Gram= Gram positif 2. Bentuk sel= bulat PERBESARAN 1000X

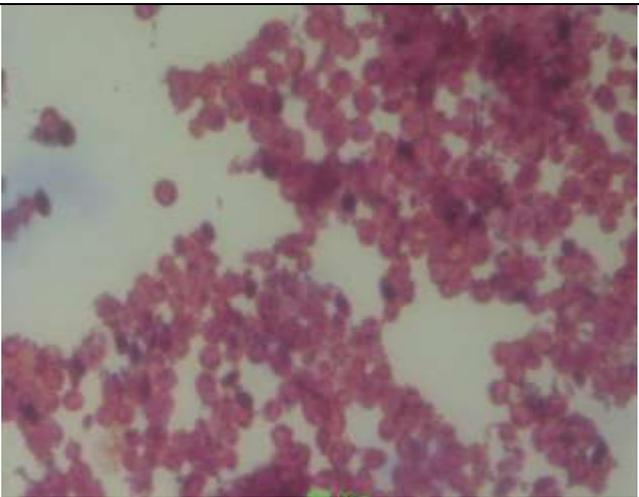
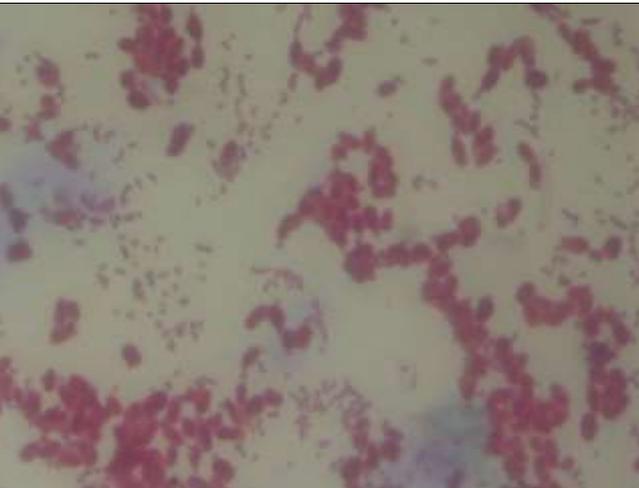
LT 4		<ol style="list-style-type: none">1. Pewarnaan Gram= Gram positif2. Bentuk sel= batang PERBESARAN 1000X
LT 5		<ol style="list-style-type: none">1. Pewarnaan Gram= Gram positif2. Bentuk sel= batang PERBESARAN 1000X
LT 6		<ol style="list-style-type: none">1. Pewarnaan Gram= Gram positif2. Bentuk sel= bulat PERBESARAN 1000X

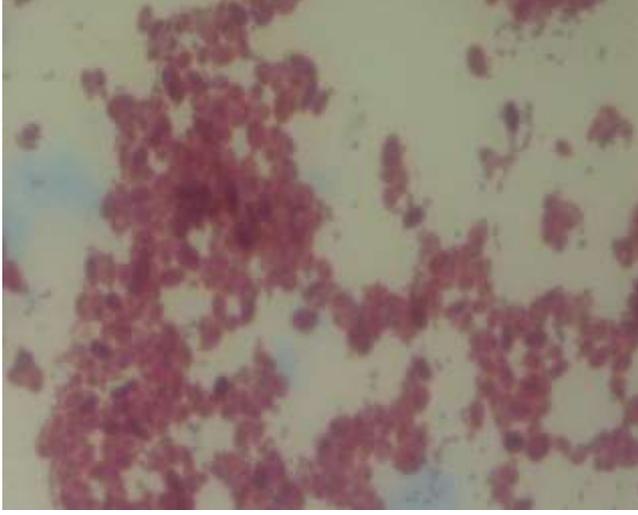
LT 7		<p>1. Pewarnaan Gram= Gram negatif</p> <p>2. Bentuk sel= bulat</p> <p>PERBESARAN 1000X</p>
LT 8		<p>1. Pewarnaan Gram= Gram negatif</p> <p>2. Bentuk sel= bulat</p> <p>PERBESARAN 1000X</p>

3.3 Pewarnaan endospora

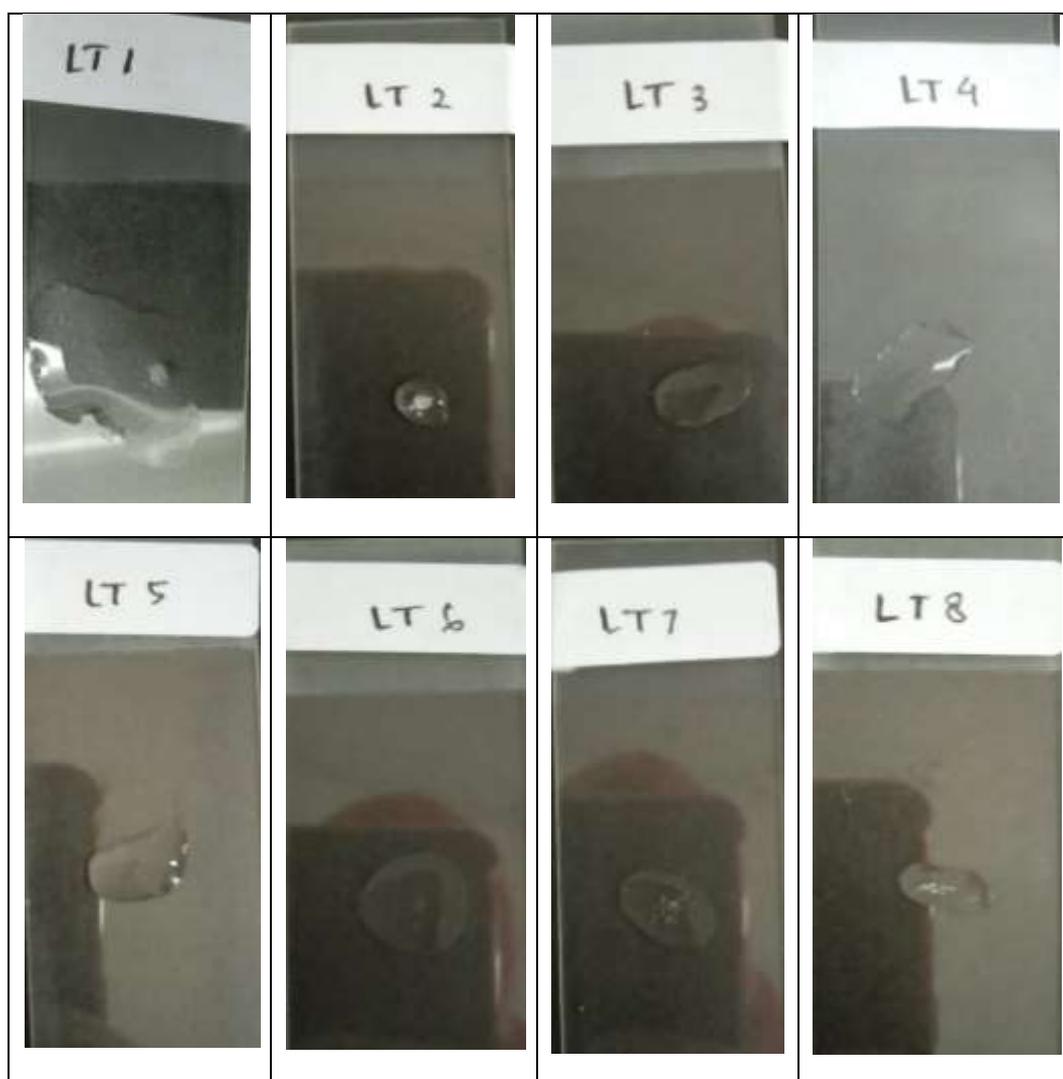
Kode Sampel	Foto Hasil Pengamatan	Keterangan
LT 1		<p>1. Endospora= negatif</p> <p>PERBESARAN 1000X</p>

LT 2		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X
LT 3		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X
LT 4		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X

LT 5		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X
LT 6		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X
LT 7		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X

LT 8		1. Endospora= negatif PERBESARAN 1000X
------	--	---

3.4 Uji katalase

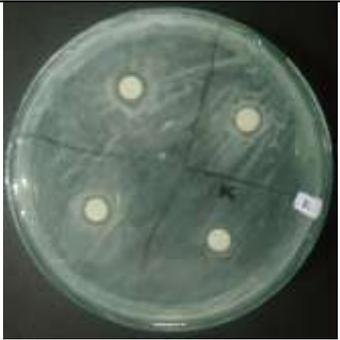


3.5 Uji pembentukan gas

			
LT 1	LT 2	LT 3	LT 4
			
LT 5	LT 6	LT 7	LT 8

Lampiran 4. Hasil uji antibakteri dari ekstrak bakteriosin terhadap bakteri uji

Kode Isolat	Bakteri Uji	Foto Pengamatan	
LT 3	<i>Bacillus subtilis</i>		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
LT 4	<i>Bacillus subtilis</i>		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

LT 5	<i>Bacillus subtilis</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
LT 6	<i>Bacillus subtilis</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			

Lampiran 5. Kartu konsultasi pembimbing I



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ganyama No. 50 Malang 65144 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Endah Eri
NIM : 18620040
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2021/2022
Pembimbing : Ir. Hj. Liliek Harianie AR., M.P
Judul Skripsi : Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* Dan *Pseudomonas aeruginosa*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	06/12/2021	Konsultasi judul skripsi	
2.	13/12/2021	Pengumpulan BAB I	
3.	20/12/2021	Konsultasi BAB I	
4.	28/12/2021	Pengumpulan BAB I (revisi ke-1) dan pengumpulan BAB III	
5.	10/01/2022	Konsultasi BAB I (revisi ke-2) dan III	
6.	21/01/2022	Revisi BAB I, II, III	
7.	25/01/2022	Konsultasi BAB I, II, III	
8.	04/02/2022	Revisi BAB I, II, III	
9.	15/02/2022	Acc proposal skripsi	
10.	13/06/2022	Konsultasi BAB IV	
11.	20/06/2022	Revisi BAB IV	
12.	27/06/2022	Konsultasi BAB IV dan V	
13.	30/06/2022	Revisi BAB IV dan V	
14.	05/07/2022	Acc naskah skripsi	

Pembimbing Skripsi I

Ir. Hj. Liliek Harianie AR., M.P

NIP. 19620901 199803 2 001

05 Juli 2022
Program Studi,

Erika Sandi Savitri, M.P

NIP. 19741018 200312 2 002

Lampiran 6. Kartu konsultasi pembimbing II



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Endah Eni
NIM : 18620040
Program Studi : SI Biologi
Semester : Ganjil TA 2021/2022
Pembimbing : Dr. M. Imamudin, M.A
Judul Skripsi : Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* Dan *Pseudomonas aeruginosa*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	04/02/2022	Konsultasi integrasi BAB 1 dan 2	<i>M. Imamudin</i>
2.	11/02/2022	Konsultasi revisi proposal skripsi BAB 1 dan 2	<i>M. Imamudin</i>
3.	11/02/2022	ACC proposal skripsi	<i>M. Imamudin</i>
4.	03/06/2022	Konsultasi integrasi BAB IV	<i>M. Imamudin</i>
5.	08/06/2022	Revisi integrasi BAB IV	<i>M. Imamudin</i>
6.	21/06/2022	Konsultasi integrasi BAB IV	<i>M. Imamudin</i>
7.	23/06/2022	Konsultasi integrasi BAB I,II dan IV	<i>M. Imamudin</i>
8.	30/06/2022	Revisi integrasi BAB I,II dan IV	<i>M. Imamudin</i>
9.	05/07/2022	Acc naskah skripsi	<i>M. Imamudin</i>
10.			

Pembimbing Skripsi II

Dr. M. Imamudin, M.A

NIP. 19740602 200901 1 010



05 Juli 2022
Program Studi,

Sandi Savitri, M.P

NIP.19741018 200312 2 002

Lampiran 7. Bukti Checklist Plagiasi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Endah Eni
NIM : 18620040
Judul : Aktivitas Bakteriosin Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Limbah Cair Tempe Dalam Menghambat Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc	21%	
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Dr. Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD. Med. Sc		



Makassar, 10 Juli 2021,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002