

**PRODUKSI BAKTERIOSIN
ASAL *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020
SEBAGAI ANTIMIKROBA DAN STABILITASNYA PADA VARIASI
SUHU PEMANASAN, SUHU PENYIMPANAN DAN PH**

SKRIPSI

Oleh:
**NADYA SUWAYVIA
NIM. 12620050**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017**

PRODUKSI BAKTERIOSIN ASAL
Lactobacillus plantarum FNCC 0020
SEBAGAI ANTIMIKROBA DAN STABILITASNYA PADA VARIASI
SUHU PEMANASAN, SUHU PENYIMPANAN DAN PH

SKRIPSI

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)

Oleh:
NADYA SUWAYVIA
NIM. 12620050

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017

**PRODUKSI BAKTERIOSIN ASAL *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020
SEBAGAI ANTIMIKROBA DAN STABILITASNYA PADA VARIASI
SUHU PEMANASAN, SUHU PENYIMPANAN DAN pH**

SKRIPSI

Oleh :

NADYA SUWAYVIA

NIM. 12620050

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :

Tanggal : 05 Januari 2017

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Ir. Hj. Liliek Harianie, A.R., M.P
NIP. 19620901 199803 2 001

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



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

**PRODUKSI BAKTERIOSIN ASAL *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020
SEBAGAI ANTIMIKROBA DAN STABILITASNYA PADA VARIASI
SUHU PEMANASAN, SUHU PENYIMPANAN DAN pH**

SKRIPSI

Oleh :
NADYA SUWAYVIA
NIM. 12620050

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 05 Januari 2017

Penguji Utama : Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si ()
NIP. 19650509 199903 2 002

Ketua Penguji : Anik Maunatin, M.P ()
NIP. 2014 0201 2412

Sekretaris Penguji : Ir. Hj. Liliek Harianie A.R., M.P ()
NIP. 19620901 199803 2 001

Anggota Penguji : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A ()
NIP. 19731212 199803 1 001

Mengetahui dan Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nadya Suwayvia

NIM : 12620050

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi

Judul : Produksi Bakteriosin Asal *Lactobacillus Plantarum*
FNCC 0020 sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada
Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan pH

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

Malang, 20 Agustus 2016

Yang membuat pernyataan,



Nadya Suwayvia

NIM. 12620059

MOTTO

خير الناس أنفعهم للناس

*“Sebaik-baik manusia adalah
yang bermanfaat untuk manusia lainnya”*



HALAMAN PERSEMBAHAN

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

Penulis mempersembahkan karya ini kepada Ibu Hj. Jauharoh dan Ayah H.M. Rofi'i Ismail Assholichy, yang telah memberikan doa dan dukungan tiada henti untuk keberhasilan penulis, kepada Nenek Hj. Makfiati, kepada kakak tersayang Alm. H. Danial Eka, serta kedua adik tersayang M. Ilyasin As-syi'bi dan Aulivia Mayasiry.

Tak lupa juga penulis ucapkan terimakasih kepada sahabat-sahabat (Aji, Syara, Umda, Faiz, Sandi, Anik, Emil, Nita, Naim, Iza, Rurin, Mbak Beti, Nayla dan seluruh teman-teman koloni mikrobiologi 2012 lainnya) dan keluarga besar Biologi 2012 yang tidak dapat disebutkan satu persatu, serta semua pihak yang telah membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Terimakasih atas segala semangat, doa, dukungan, keceriaan, kritik, saran, nasihat, dan perhatian yang telah diberikan.

Malang, 20 Agustus 2016

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

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

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardja, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah memberikan kesempatan belajar di jenjang S-1 ini.
2. Dr. Drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Liliek Harianie, Anik Maunatin M.P dan Dr. H. Ahmad Barizi, M. A selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga dan semoga bermanfaat.
5. Segenap sivitas akademika Jurusan Biologi, terutama dosen dan laboran terimakasih yang tidak terhingga atas semua ilmu dan bimbingannya.
6. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun doa.

Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca dan penulis. Amin Ya Robbal Alamiin.

Malang, 20 Agustus 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR REAKSI	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
مخلص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Hipotesis	8
1.5 Manfaat	8
1.6 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteri dalam Al Quran	10
2.2 Kajian Makanan dalam Al Quran	11
2.3 Bakteri Asam Laktat	13
2.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	15
2.5 Bakteriosin	16
2.5.1 Klasifikasi Bakteriosin	19
2.5.2 Biosintesis dan Produksi Bakteriosin	20
2.5.3 Mekanisme Kerja Bakteriosin	22
2.5.4 Aplikasi Bakteriosin	23

3.5.11.2 Pengaruh Suhu Penyimpanan terhadap Stabilitas Bakteriosin	40
3.5.11.3 Pengaruh pH terhadap Stabilitas Bakteriosin.....	40
3.6 Analisa Data.....	41
3.7 Alur Penelitian	42
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>L.plantarum</i>	43
4.2 Produksi dan Purifikasi Bakteriosin	46
4.2.1 Produksi Bakteriosin	46
4.2.2 Purifikasi Parsial dengan Amonium Sulfat dan Dialisis	50
4.2.3 Pengukuran Konsentrasi Protein Hasil Pemurnian.....	53
4.3 Karakterisasi Bakteriosin.....	55
4.3.1 Stabilitas Bakteriosin terhadap Pemanasan	55
4.3.2 Stabilitas Bakteriosin terhadap Suhu Penyimpanan	59
4.3.3 Stabilitas Bakteriosin terhadap pH	61
4.4 Kajian Keislaman Mengenai Bakteriosin	64
 BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	68
5.2 Saran	68
 DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	81

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Uji Antagonistik Supernatan Netral terhadap Bakteri Indikator	50
Tabel 4.2 Konsentrasi Protein Bakteriosin asal <i>L. plantarum</i> FNCC 0020	57
Tabel 4.3 Pengaruh Variasi Suhu Pemanasan terhadap Bakteriosin <i>L. plantarum</i> FNCC 0020 pada Bakteri Indikator	58
Tabel 4.4 Pengaruh Variasi Suhu Penyimpanan terhadap Bakteriosin <i>L.</i> <i>plantarum</i> FNCC 0020 pada Bakteri Indikator	63
Tabel 4.5 Pengaruh Variasi pH terhadap Bakteriosin <i>L. plantarum</i> FNCC 0020 pada Bakteri Indikator	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Biosintesis Bakteriosin23
 Gambar 2.2 Dialisis.....28
 Gambar 2.3 *Staphylococcus aureus*32
 Gambar 2.4 *Escherichia coli*.....33
 Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan Isolat *L.plantarum* FNCC 002046
 Gambar 4.2 Aktivitas Penghambatan SBS terhadap *Escherichia coli* dan
Staphylococcus aureus.....52



DAFTAR REAKSI

Reaksi 4.1 Penetralan Asam Laktat dengan NaOH	50
---	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Reagen dan Media	81
L.1.1 Pembuatan Reagen Lowry	81
L.1.2 Pembuatan Buffer	81
L.1.3 Pembuatan NaOH 1N	82
L.1.4 Pembuatan BaCl ₂	82
L.1.5 Pembuatan Media Produksi Bakteriosin.....	83
Lampiran 2. Preparasi Kantong Selofan	83
Lampiran 3. Pembuatan Kurva Standar Protein.....	83
L.3.1 Pembuatan Larutan Standar Protein.....	83
L.3.2 Hasil Pengukuran Absorbansi BSA	85
L.3.3 Menentukan Konsentrasi Protein Bakteriosin	86
L.3.4 Data Absorbansi dan Konsentrasi Protein Bakteriosin.....	86
Lampiran 4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> FNCC 0020	87
L.4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi <i>L.plantarum</i>	87
L.4.2 Kurva Pertumbuhan <i>L.plantarum</i>	87
Lampiran 5. Penentuan Penambahan Amonium Sulfat	88
Lampiran 6. Hasil Purifikasi Bakteriosin.....	89
L.6.1 Kodisi pH Supernatan Bebas Sel dan Supernatan Netral	89
L.6.2 Hasil Uji Antagonistik Supernatan Netral	89
Lampiran 7. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteriosin terhadap Bakteri Indikator	89
L.7.1 Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi pH.....	89
L.7.2 Stabilitas Bakteriosi terhadap Variasi Suhu Pemanasan.....	90
L.7.3 Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi Suhu Penyimpanan.....	90
Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian.....	91
Lampiran 9. Aktivitas Bakteriosin terhadap Bakteri Indikator.....	92
Lampiran 10. Perhitungan Statistik Hasil Penelitian Diameter Zona Hambat Bakteriosin dengan SPSS	94

ABSTRAK

Suwayvia, Nadya. 2016. 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 Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Ir. Hj. Liliék Harianie AR, M.P. Pembimbing Agama: Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Kata Kunci: *L. plantarum* FNCC 0020, Bakteriosin, Stabilitas

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada berbagai habitat yang luas. Selain menghasilkan asam laktat, spesies BAL yaitu *L. plantarum* dapat memproduksi bakteriosin yang merupakan suatu protein yang bersifat antimikroba. Purifikasi bakteriosin diperlukan untuk mendapatkan bakteriosin murni tanpa adanya campuran dari senyawa lain yang dihasilkan oleh BAL. Karakterisasi bakteriosin dapat membantu mengetahui stabilitas bakteriosin pada berbagai kondisi yang berguna untuk mendapatkan kondisi yang sesuai untuk pengaplikasian bakteriosin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas bakteriosin yang dihasilkan *L. plantarum* pada berbagai suhu pemanasan, suhu penyimpanan dan pH.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 faktor yang masing-masing faktor terdiri dari 4 perlakuan dan 6 ulangan. Stabilitas bakteriosin ditentukan dengan menguji aktivitas hambatnya pada variasi suhu pemanasan (suhu ruang, 80, 100 dan 121)°C; variasi suhu penyimpanan (suhu ruang, 18, 4, -20) °C; dan variasi pH (4, 5, 6, dan 7). Data diameter zona hambat (mm) dianalisis menggunakan *Anova One Way* dan apabila terdapat pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan Uji Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa supernatan bebas sel netral asal *L. plantarum* dapat menghambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil purifikasi menunjukkan bahwa konsentrasi protein bakteriosin *L. plantarum* adalah sebesar 352,86 µg/ml. Bakteriosin asal *L. plantarum* stabil pada suhu ruang hingga suhu 121°C, stabil pada suhu penyimpanan 4°C dan -20°C serta stabil pada kisaran pH 4 – 7.

ABSTRACT

Suwayvia, Nadya. 2016. The Production of Bacteriocin by *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 as Antimicrobials and The Stability at Heating Temperature, Storage Temperature and pH Variation. Skripsi, Biology Department, Science and Technology Faculty, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang . Biology Advisor: Ir. Hj. Liliek Harianie AR, M.P. Religi Advisor: Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Keyword: *L. plantarum* FNCC 0020, Bacteriocin, Stability

Lactic acid bacteria (LAB) is a facultative anaerobic bacteria living on a wide habitat variety. In addition to produce lactic acid, LAB species *L. plantarum* can produce bacteriocins (a protein that have an antimicrobial characteristic). Purification of bacteriocins required to obtain pure bacteriocins without any mixture of other compounds produced by BAL. Characterization of bacteriocins can help to determine the stability of bacteriocins in various conditions that are useful to obtain the appropriate conditions for the application of bacteriocins. This study aims to determine the stability of bacteriocins produced by *L. plantarum* at various heating temperature, storage temperature and pH.

This study uses a completely randomized design (CRD) with three factors, each factor consists of 4 treatments and 6 replications. Bacteriocins stability is determined by testing the inhibitory activity on the heating temperature variation (room temperature, 80, 100 and 121) ° C; in storage temperature variation (room temperature, 18, 4, -20) ° C; and in pH variation (4, 5, 6, and 7). Data of inhibition zone (mm) were analyzed using One Way Anova and if there is a treatment effect continued with Duncan test.

The results showed that the neutral cell free supernatant of *L. plantarum* can inhibit *E. coli* and *S. aureus*. The results of purification showed that the concentration of protein bacteriocins of *L. plantarum* was 352.86 µg / ml. Bacteriocins from *L. plantarum* is stable at room temperature up to 121 ° C, stable to storage at temperature 4 ° C and -20 ° C and stable at pH range of 4-7.

المُلخَص

سوفيا، نادي. 2016. إنتاج جرثوم بكتيريوسين (Bakteriosin) الملبنة (*Lactobacillus plantarum* FNCC 0020) كمضادات الميكروبية واستقرارها في اختلاف درجة حرارة التدفئة ودرجة حرارة التخزين ودرجة الحموضة. البحث الجامعي. قسم علم الحياة كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج. المشرف: الحاجة ليليك حاربياني، الماجستير. المشرف الديني: الدكتور الحاج أحمد باريز، الماجستير.

الكلمة الرئيسية: *L. plantarum* FNCC 0020، Bakteriosin، الاستقرار.

بكتيريا حمض اللبنك (LAB) هو البكتيريا الاختيارية اللاهوائية كانت قادرة على العيش في تشكيلة واسعة من الموائل. بالإضافة إلى إنتاج حمض اللاكتيك، النوع *L. plantarum* كانت قادرة على إنتاج بكتيريوسين هو الذي البروتين المضادة للميكروبات. تنقية بكتيريوسين مطلوبة للإنتاج بكتيريوسين النقية بدو الخليط من المركبات الأخرى التي تنتجها BAL. يساعد توصيف بكتيريوسين في تحديد استقرار بكتيريوسين في الظروف المختلفة وهي مفيدة للحصول على الظروف المناسبة لتطبيق بكتيريوسين. والهدف من هذه الدراسة لتحديد استقرار بكتيريوسين التي تنتجها *L. plantarum* في درجة الحرارة التدفئة المختلفة ودرجة حرارة التخزين ودرجة الحموضة.

تستخدم هذه الدراسة تصميم البحث العشوائية الكاملة (RAL) بثلاثة العوامل وكل عامل يتكون من 4 المعالجات و6 المكررات. يتم تحديد الاستقرار بكتيريوسين عن طريق تجربة نشاط الكابح بشكل خاص على اختلاف درجة الحرارة التدفئة (درجة حرارة الغرفة، 18، 4، -20°C). والاختلافات في درجة حرارة التخزين (درجة حرارة الغرفة، 18، 4، -20°C). والاختلافات في درجة الحموضة (4، 5، 6، 7). وقد تم تحليل قطر منطقة التثبيط البيانات (mm) باستخدام طريقة *Anova One Way* وإذا كان فيه تأثير العلاج يستمر بالتجربة Duncan.

وأظهرت النتائج من هذه الدراسة أن supernatan خالية من الخلايا المحايد من *L. plantarum* كان قادرا أن يمنع البكتيريا الإشريكية القولونية (*E. coli*) والعنقودية الذهبية (*S. aureus*). وأظهرت النتائج أن تركيز تنقية البروتين بكتيريوسين من *L. plantarum* كان 352.86 ميكروغرام/ml. أصل بكتيريوسين من النوع *L. plantarum* هي مستقرة في درجة حرارة الغرفة حتى 121°C، و مستقرة في درجة حرارة التخزين عند 4°C و -20°C ومستقرة في درجة الحموضة من 4-7.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Keamanan pangan diartikan sebagai kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia (Saparinto dan Hidayati, 2006). Beberapa bahan pangan yang berasal dari komoditas peternakan umumnya bersifat *perishable*/mudah rusak, contohnya daging yang sangat rentan terhadap mikroorganisme patogen dan pembusuk (Sihombing, 2014).

Mutu daging dapat dinilai dari tingkat kontaminan mikrobial patogen. Kontaminasi yang disebabkan oleh mikroba seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* dan lain-lain sangat dimungkinkan karena sifat fisikokimia daging (*water activity*/aw, pH dan zat gizi) mendukung untuk pertumbuhan berbagai jenis mikroba (Hugas, 1998). Kontaminasi oleh mikroba patogen dapat menyebabkan degradasi protein. Hal ini menyebabkan sel-sel pada daging mengalami kerusakan atau menjadi busuk.

Usaha mengontrol keberadaan mikroorganisme pada bahan pangan dapat dilakukan dengan metode pengawetan/preservasi. Bahan pengawet alami yang sering digunakan salah satunya yaitu kunyit. Namun, penggunaan kunyit sebagai bahan pengawet menimbulkan perubahan dalam rasa, warna maupun bau dari bahan pangan. Purselove (1981) menyebutkan bahwa kunyit mempunyai rasa dan bau yang khas yaitu pahit dan getir serta berbau langu. Selain kunyit, garam

juga umumnya digunakan sebagai pengawet khususnya pada produk hasil laut. Namun penggunaan garam pun juga memiliki beberapa kekurangan. Mustafa (2006) menyatakan bahwa penggunaan garam sebagai pengawet mempengaruhi penerimaan rasa dari jenis pangan.

Allah berfirman dalam Surat Al-A'raf (7): 56.

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

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

Lafadz *المحسنين* pada ayat di atas dalam *Tafsir Jalalain* bermakna orang yang berbuat baik, yakni orang-orang yang berbuat taat. Dalam konteks biologi, lafadz *almuhsinin* dapat diartikan pula sebagai orang-orang yang melakukan perbaikan termasuk di dalamnya yaitu seorang peneliti. Adanya permasalahan dalam preservasi pangan ini menjadi tantangan bagi para peneliti sebagai seorang yang *muhsin* untuk mengembangkan sistem pengawetan baru yang dapat mempertahankan kualitas dan memperpanjang umur simpan bahan pangan tanpa mempengaruhi cita rasanya.

Salah satu metode pengawetan secara alami adalah dengan penambahan zat antimikroba atau biopreservasi. Biopreservasi sangat potensial untuk diaplikasikan dalam pengawetan pangan karena dapat mengontrol pertumbuhan bakteri patogen secara alami dan aman (Mataragas, 2003). Zat antimikroba alami yang termasuk *Generally Recognize as Safe* (GRAS) banyak dihasilkan dari

golongan bakteri asam laktat (BAL). BAL dapat menghasilkan produk metabolit sekunder berupa senyawa protein yang disebut bakteriosin yang memiliki sifat antimikroba (Jati, 2012). Beberapa galur BAL dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa protein yang disebut bakteriosin dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri gram positif dan negatif (Harianie, 2013).

Allah berfirman dalam surat Yunus (10): 61.

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

Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuz)”.

Terma bakteri dalam ayat Al Quran di atas dapat dirujuk melalui kalimat “dzarrah” yang bermakna partikel yang berukuran sangat kecil. Lafadz “dzarrah” ini tidak hanya mencakup kebendaan saja, melainkan juga binatang maupun tumbuhan yang berukuran sangat kecil atau mikro, tidak terkecuali dengan makhluk hidup bersel tunggal seperti bakteri. Salah satu dari sekian banyak jenis bakteri tersebut adalah bakteri asam laktat (BAL).

Pemakaian bakteriosin komersial sebagai biopreservatif sudah dilakukan di beberapa negara dan diaplikasikan pada beberapa jenis makanan. Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga potensial digunakan sebagai biopreservasi yaitu

bukan merupakan bahan toksik dan mudah mengalami degradasi oleh enzim proteolitik dalam saluran pencernaan manusia karena merupakan senyawa protein. Bakteriosin juga stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin (Cleveland *et al.*, 2001).

Bakteriosin dapat diproduksi oleh *Lactococcus*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus* yang berasal dari berbagai sumber (Cleveland *et al.*, 2001). Setiap bakteriosin memiliki keunikan tertentu dalam menghambat mikroba patogen. Inilah sebabnya mengapa eksplorasi dan pemurnian bakteriosin baru akan selalu bermanfaat (Merzoug, 2015). Eksplorasi BAL penghasil bakteriosin selama ini fokus pada isolat BAL yang berasal dari produk-produk berbasis susu seperti susu segar (Sankar, 2012), yoghurt (Abo-Amer, 2007), keju (Cotelo, 2013) dan makanan fermentasi seperti sawi asin (Rachmawati, 2005), ogi/ makanan fermentasi singkong asal Nigeria (Ogunbawo, 2003), *chinese pickle* (Zhou, 2014), dan fermentasi sayuran (Joshi, 2006). Sedangkan eksplorasi BAL penghasil bakteriosin asal sayuran atau buah-buahan segar belum banyak dilakukan.

Salah satu spesies dari genus *Lactobacillus* yang potensial menghasilkan bakteriosin adalah *Lactobacillus plantarum*. Anas (2008) menyebutkan bahwa *L. plantarum* mempunyai kemampuan untuk menghambat mikroorganisme patogen dengan daerah penghambatan sebesar 28 mm dibandingkan BAL lainnya yaitu *L. casei* mampu menghambat mikroorganisme patogen sebesar 26 mm, *L. rhamnosus* sebesar 19 mm, *L. acidophilus* sebesar 16 mm dan *L. sakei* sebesar

25 mm. Harianie (2013) melaporkan bahwa bakteriosin asal *L.plantarum* DJ3 hasil isolasi dari saluran pencernaan itik mampu menghambat bakteri *E.coli* sebesar 4 mm dan *S. aureus* sebesar 5,33 mm.

Studi mengenai kemampuan antimikroba dari bakteri sangat terbatas dan belum sepenuhnya dimanfaatkan. Bakteriosin terlebih dahulu perlu di purifikasi dan dikarakterisasi untuk mengetahui sifat dan ciri-cirinya sebelum nantinya dapat diaplikasikan pada bahan pangan.

Karakterisasi terhadap bakteriosin dapat dilakukan dengan beberapa uji untuk mengetahui stabilitasnya. Diantara uji karakterisasi tersebut adalah uji resistensi terhadap pemanasan, suhu penyimpanan dan stabilitasnya pada berbagai pH. Pemanasan merupakan metode yang umum digunakan dalam pengolahan makanan termasuk daging dan produk olahan asal daging untuk memusnahkan mikroorganisme pembusuk dan patogen yang terdapat pada bahan makanan. Proses pemanasan yang digunakan pada pengolahan makanan seperti pasteurisasi pada suhu sedang atau moderat dengan suhu produk berkisar 58-80°C dan sterilisasi dengan menggunakan suhu tinggi diatas 100°C untuk menghasilkan produk yang bebas mikroorganisme.

Beberapa bakteriosin yang tahan terhadap pemanasan telah dilaporkan seperti Joshi *et al.*, (2006) yang melaporkan bahwa aktivitas bakteriosin dari isolat asal sayur fermentasi dapat stabil sampai dengan pemanasan pada suhu 100°C tetapi aktivitas antimikrobanya jauh lebih rendah dibandingkan dengan pemanasan pada suhu 68°C. Gonzales *et al.*, (1994) juga melaporkan bahwa bakteriosin yang diproduksi *L. plantarum* yang diisolasi dari susu menunjukkan

aktivitas yang sangat stabil pada pemanasan suhu 100°C selama 60 menit dan 121°C selama 10 menit. Kestabilan bakteriosin yang dihasilkan *L. plantarum* terhadap berbagai suhu panas ini dikarenakan formasi protein bakteriosin yang globuler sehingga menyebabkan kuatnya bagian yang hidrofobik. Selain itu, banyaknya asam amino jenis sistein sebagai penyusun bakteriosin menjadikan strukturnya stabil (Najim, 2012).

Faktor pH juga menentukan keamanan bahan pangan (Usmiati, 2007). Faktor pH seringkali menjadi pertimbangan bagi bahan pengawet yang akan digunakan pada bahan pangan, khususnya bagi pangan hasil peternakan dengan kondisi pH rendah seperti daging sapi, ham, bakso, susu, butter, keju dan lain-lain. Sedangkan, beberapa bakteri patogen dan pembusuk makanan seperti *E.coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat bertahan hidup pada kondisi pH yang rendah (asam). Bakteriosin asal *L. plantarum* juga dilaporkan stabil pada rentang pH yang luas mulai pH 2-8 (Ogunbawo, 2003). Hal ini dikarenakan titik isoelektrik bakteriosin asal *L. plantarum* berada pada 8,0 – 9,0, dimana semakin tinggi nilai pH maka solubilitasnya semakin menurun. Hal ini yang menjadikan bakteriosin mampu stabil pada pH asam hingga pH 8 (De Vuyst dan Vandamme, 1994).

Selain suhu pemanasan dan pH, faktor lain yang turut berperan dalam menjaga keamanan pangan adalah suhu penyimpanan. Pendinginan merupakan metode untuk mengawetkan bahan pangan. Metode pendinginan ini belum menjamin pertumbuhan bakteri pada bahan pangan, seperti golongan bakteri psikrofil, dapat terhambat.

Penambahan bakteriosin sebagai biopreservatif dapat menjadi alternatif untuk permasalahan keamanan bahan pangan. Bakteriosin diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan patogen pada produk olahan daging setelah pemanasan maupun produk yang ber-pH rendah. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian dengan judul “*Produksi Bakteriosin asal Lactobacillus plantarum FNCC 0020 sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan pH*” ini perlu dan penting untuk dilaksanakan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Apakah bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 stabil terhadap pengaruh variasi suhu pemanasan?
2. Apakah bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 stabil terhadap pengaruh variasi suhu penyimpanan?
3. Apakah bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 stabil terhadap pengaruh variasi pH?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Mengetahui stabilitas bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 terhadap pengaruh variasi suhu pemanasan.

2. Mengetahui stabilitas bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 terhadap pengaruh variasi suhu penyimpanan.
3. Mengetahui stabilitas bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 terhadap pengaruh variasi pH.

1.4 Hipotesis

Adapun hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 dapat tetap stabil dengan pengaruh variasi suhu pemanasan.
2. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 dapat tetap stabil dengan pengaruh variasi suhu penyimpanan.
3. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 dapat tetap stabil dengan pengaruh variasi pH.

1.5 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Sebagai sumber informasi bagi masyarakat mengenai pemanfaatan senyawa dari bakteri asam laktat sebagai biopreservasi bahan pangan.
2. Menjadi informasi dan pengetahuan dalam bidang industri mengenai sifat bakteriosin yang dapat dimanfaatkan sebagai biopreservasi sehingga dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sintetis.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Isolat *Lactobacillus plantarum* yang digunakan merupakan hasil isolasi dari sayuran kubis koleksi dari *Food and Nutritional Culture Collection* (FNCC) nomor 0020 Universitas Gadjah Mada.
2. Media yang digunakan untuk produksi bakteriosin adalah *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) yang ditambahkan dengan *yeast extract*.
3. Media yang digunakan dalam uji konfrontasi dengan bakteri indikator adalah *Nutrient Agar* (NA).
4. Bakteri indikator yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
5. Purifikasi bakteriosin menggunakan metode presipitasi dengan amonium sulfat dan dialisis.
6. Variasi suhu yang digunakan adalah suhu ruang, 80°C, 100°C dan 121°C.
7. Variasi pH yang digunakan adalah pH 4, 5, 6 dan 7.
8. Variasi suhu penyimpanan yang digunakan adalah suhu ruang, 18°C, 4°C dan -20°C.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri dalam Al Quran

Bakteri merupakan organisme mikroskopis dengan diameter rata-rata 1,25 µm. Bakteri memiliki ciri-ciri uniseluler mikroskopis, umumnya tidak berklorofil dan termasuk sel prokariotik. Bakteri dapat ditemukan hampir di semua tempat dan tumbuh dengan subur di udara, air, makanan, tanah, tubuh hewan dan tumbuhan yang dapat bersifat saprofit atau parasit (Campbell, 2008).

Keberadaan bakteri ini disebutkan Allah SWT dalam Al Quran surat Yunus (10): 61 sebagai berikut:

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

Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar Dzarrah (atom) di bumi maupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfudz)”.

Dalam *Tafsir Jalalain*, As-Syuyuthi dan Jalalain menjelaskan bahwasanya yang dimaksud dengan lafadz “dzarrah” disini adalah semut yang paling kecil. Musthofa (1942) dalam *Tafsir Al Maraghi* mendefinisikan dzarrah sebagai semut kecil dan segala sesuatu yang menyerupainya, seperti halnya debu dan juga cahaya matahari. Sedangkan Bahreisy (1988) dalam *Tafsir Ibn Katsir* menyatakan bahwa Allah SWT mengetahui segala sesuatu mengenai makhlukNya setiap saat.

Tidak ada sesuatu walau seberat *dzarrah* atau lebih kecil dari itu yang luput dari jangkauan pengetahuannya. Sementara Al Jazairi (2007) dalam *Tafsir Al Aisar* memaparkan bahwa Allah SWT memberitahukan tentang keluasan ilmu dan pengetahuannya atas semua makhluknya. Tidak ada satupun yang luput dari pengetahuannya meskipun sekecil *dzarrah*, yaitu semut kecil baik yang terdapat di muka bumi ini maupun yang berada di atas langit, baik sesuatu itu lebih kecil lagi daripada semut kecil itu atukah lebih besar darinya.

Berdasarkan beberapa tafsiran dari surat Yunus (10):61 di atas dapat ditarik ikhtisar bahwa lafadz “*dzarrah*” merupakan segala sesuatu yang berukuran kecil, baik yang dapat dilihat dengan mata telanjang maupun segala sesuatu yang membutuhkan alat khusus untuk melihatnya. Maka, dari terma ini lafadz *dzarrah* dalam ranah biologi dapat pula ditafsirkan sebagai bakteri.

2.2 Kajian Makanan dalam Al Quran

Allah SWT berfirman dalam Surat Al Baqarah (2): 168 yang berbunyi:

يَأْتِيهَا النَّاسُ كُلُّوْا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ

مُبِينٌ

Artinya: “*Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan, karena sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu.*”

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT memerintahkan untuk mengonsumsi makanan yang halal. Makna dari kalimat *حلالا* yaitu segala sesuatu yang wujud barangnya dan cara memperolehnya dibenarkan oleh syariat.

Sebagaimana menurut Departemen Agama RI (2000), halal dibagi menjadi 2 yaitu halal menurut zatnya dan halal menurut cara memperolehnya. Halal menurut zatnya yaitu bukan termasuk barang-barang yang haram menurut agama Islam, seperti bangkai, darah, babi, dan khamr. Sedangkan halal menurut cara memperolehnya yaitu diperoleh dengan cara-cara yang dihalalkan oleh agama, seperti dengan cara membeli, pemberian, meminjam dan sebagainya. Bukan dengan cara-cara yang dilarang oleh agama seperti mencuri, merampas, menipu, korupsi, riba, judi dan sebagainya. Dan kemudian makna dari kalimat طيباً adalah lawan dari *khabitsan* atau jelek/menjijikan, perkara yang baik adalah perkara yang secara akal dan fitrah dianggap baik.

Selain syarat “*halalan*”, makanan dalam surat Al Baqoroh (2):168 di atas diberi sifat “*thayyiban*”. Dalam *Tafsir Jalalain*, lafadz “*thayyiban*” bermakna segala yang suci tidak najis, bermanfaat dan tidak membahayakan. Dalam konteks Biologi, lafadz “*halaalan thayyiban*” diartikan sebagai makanan yang halal untuk dikonsumsi haruslah yang baik bagi tubuh. Makanan yang baik bagi tubuh yaitu makanan yang mengandung berbagai makromolekul dan mikromolekul yang dibutuhkan tubuh seperti vitamin, protein dan kalsium.

Lafadz selanjutnya dalam ayat di atas yaitu “*wa laa tattabi’u khutuwaatisy syaitaan*” yang artinya dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan. Langkah syaitan dalam ayat diatas menurut *Tafsir Jalalain* diartikan sebagai tindakan menghalalkan atau mengharamkan dari diri sendiri. Termasuk di dalamnya mengkonsumsi barang-barang haram. Qatadah dan As Suddiy berpendapat bahwa semua kemaksiatan kepada Allah termasuk mengikuti

langkah-langkah syaitan. Perbuatan menambahkan bahan pengawet sintetis berbahaya dalam makanan juga merupakan salah satu bentuk mengikuti langkah syaitan. Hal ini dikarenakan bahan pengawet sintetis tersebut dapat memberikan efek negatif bagi diri sendiri maupun orang lain, yang mana zat-zat kimia sintetis tersebut dapat mengganggu fungsi normal tubuh.

Adanya riset dalam bidang pangan mengenai bahan preservatif alami menjadi alternatif dalam permasalahan di atas. Bahan alami yang berpotensi menjadi biopreservasi yaitu bakteriosin yang merupakan peptida protein yang memiliki sifat antimikroba. Bakteriosin yang ditambahkan dalam makanan mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan memperpanjang umur simpan bahan pangan. Selain itu, bakteriosin juga aman dan tidak toksik untuk dikonsumsi tubuh tanpa menimbulkan efek samping karena merupakan bahan alami (protein) yang mudah diuraikan oleh tubuh.

2.3 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada berbagai habitat yang cukup luas di alam seperti pada tanaman, saluran pencernaan baik pada hewan ataupun manusia, serta dalam berbagai produk makanan fermentasi seperti saos, yoghurt, sake, kedelai dan minuman-minuman fermentasi (Januarsyah, 2007). Bakteri asam laktat secara luas digunakan sebagai starter untuk fermentasi minuman, daging dan sayuran. Bakteri asam laktat umum digunakan dalam industri fermentasi saos dan berperan pula sebagai bahan flavor dan pengembang warna. Mikroorganisme ini berperan dalam

perubahan tekstur, aroma, warna, pencernaan serta kualitas nutrisi suatu produk fermentasi (Stiles, 1991).

Bakteri asam laktat memiliki karakteristik baik morfologi, fisiologi maupun metabolit tertentu. Secara umum bakteri ini merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora, memiliki bentuk batang maupun bulat dan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir mayoritas selama fermentasi karbohidrat (Axelsson, 1998). Anguirre dan Collins (1993) menyatakan bahwa bakteri asam laktat terdiri dari 4 genus, yakni *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* serta *Pediococcus*. Sedangkan Rahayu dan Magino (1997), berdasarkan revisi terbaru menyebutkan bahwa bakteri asam laktat terdiri atas 10 genus yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* dan *Vagococcus*.

Distribusi bakteri asam laktat di alam sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dari golongan makromolekul glukosa untuk melangsungkan hidupnya. Bakteri golongan ini mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah yang banyak sebagai produk akhir dari metabolisme karbohidrat. Asam laktat yang dihasilkan dapat menyebabkan terjadinya penurunan pH lingkungan pertumbuhannya serta menimbulkan cita rasa asam (asidifikasi) pada substrat. Hal ini dapat pula menghambat pertumbuhan beberapa jenis mikroorganisme patogen yang umumnya tidak tahan terhadap kondisi asam (Bachrudin, *et al.*, 2000).

Bakteri asam laktat memproduksi berbagai macam komponen metabolit sekunder seperti asam, alkohol, diasetil, hidrogen peroksida, karbondioksida dan metabolit lainnya. Berbagai metabolit memiliki spektrum yang luas dalam

melawan spesies lain dan produksi metabolit ini secara luas dipengaruhi juga oleh matriks makanan itu sendiri (Helander *et al.*, 1997). Hal penting dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya dalam menghasilkan komponen antimikroba, khususnya bakteriosin yang berpotensi menjadi biopreservatif menggantikan pengawet kimiawi pada bahan makanan guna memperpanjang umur simpan produk. Kemampuan bakteriosin dalam melakukan aktivitasnya dalam mengawetkan produk dikarenakan efek penghambatannya terhadap mikroorganisme patogen dan pembusuk (Savadogo *et al.*, 2006).

2.4 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum memiliki ciri-ciri berbentuk batang (*rod*) dan umumnya dalam rantai-rantai pendek. *Lactobacillus* termasuk bakteri Gram positif, tidak berspora, anaerob fakultatif dan sering ditemukan dalam produk susu, sereal, air, limbah, anggur, bir, buah, sayur dan produk daging. Genus *Lactobacillus* ini tumbuh baik pada suhu 30 °C – 40 °C (Pelczar dan Chan, 2008). Kuswanto dan Sudarmadji (1988) menyebutkan bahwa *Lactobacillus plantarum* bersifat kalase negatif, aerob atau aerob fakultatif, cepat mencerna protein, toleran terhadap asam, tidak mereduksi nitrat dan mampu menghasilkan asam laktat. *Lactobacillus plantarum* dalam media agar membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih *opaque*, konveks dan dikenal sebagai pembentuk asam laktat.

Menurut Holt *et al.* (2000), klasifikasi dari bakteri *Lactobacillus plantarum* adalah:

Kingdom : Bakteria
Divisi : Firmicutes
Kelas : Bacili
Ordo : Lactobacillales
Famili : Lactobacillaceae
Genus : Lactobacillus
Spesies : *Lactobacillus plantarum*

Asam laktat yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* menyebabkan turunnya pH substrat sehingga menimbulkan suasana asam. Pertumbuhan *L. plantarum* dapat menghambat kontaminasi mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat. Selain itu bakteri asam laktat dapat pula menghasilkan hidrogen peroksida yang berfungsi sebagai antibakteri. *L. plantarum* juga mempunyai kemampuan menghasilkan bakteriosin yang juga mempunyai sifat antibakteri (Buckle, 2007).

2.5 Bakteriosin

Bakteri asam laktat mampu memproduksi senyawa antimikroba selain asam laktat dan asetat. Senyawa antimikroba ini memiliki sifat antagonistik terhadap mikroorganisme dalam spektrum yang luas, sehingga dapat berkontribusi sebagai bahan pengawet pangan. Senyawa ini dihasilkan dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan asam laktat maupun asam asetat, yaitu asam format, asam lemak bebas, amonia, hidrogen peroksida, etanol, asetoin, diasetil, enzim

bakteriolitik, asetaldehid, benzoat, 2,3 butadienol, antibiotik dan juga bakteriosin. Beberapa dari senyawa-senyawa tersebut menunjukkan adanya aktivitas antagonistik terhadap berbagai jenis mikroba patogen dan pembusuk makanan (Vuyst dan Vandamme, 1994).

Senyawa antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan mikroba), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang) serta germisidal (menghambat germinasi spora bakteri). Kemampuan suatu zat antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dapat dipengaruhi berbagai faktor seperti sifat-sifat mikroba (jenis, konsentrasi, umur dan keadaan mikroba), waktu penyimpanan, konsentrasi zat pengawet, suhu lingkungan, dan sifat fisika maupun kimia dari makanan (termasuk kadar air, pH, jenis dan jumlah senyawa di dalamnya) (Fardiaz, 1992).

Bakteriosin merupakan protein antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri yang bersifat dapat membunuh ataupun menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Cleveland, *et al.*, 2001). Bakteriosin adalah senyawa protein yang dikeluarkan oleh bakteri yang memiliki sifat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya terutama yang memiliki kekerabatan secara filogenik. Protein ini mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan hewan. Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat mudah diterima sebagai bahan tambahan dalam makanan baik oleh ahli kesehatan maupun konsumen karena secara alami bakteri ini berperan dalam fermentasi (Kusmiati dan Malik, 2002).

Bakteriosin diproduksi oleh beberapa strain bakteri termasuk bakteri asam laktat (BAL). Senyawa ini disintesis oleh bakteri asam laktat. Bakteriosin bersifat mudah dicerna, berpengaruh baik terhadap kesehatan serta aktif pada konsentrasi rendah (Cleveland *et al.*, 2001). Bakteriosin yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme tidak akan memiliki efek penghambatan bagi organisme itu sendiri (Ogunbawo, 2003).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat bersifat menguntungkan dalam industri makanan terutama pada produk makanan fermentasi. Hal ini dikarenakan aktivitas dari bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri kontaminan penyebab pembusukan dan penyakit yang ditularkan melalui makanan (*food borne illness*). Penambahan bakteriosin kedalam makanan berguna untuk mencegah terjadinya pembusukan, memperpanjang waktu simpan dan menghambat pertumbuhan atau bahkan membunuh bakteri patogen dan pembusuk (Sri, 2009).

Bakteriosin merupakan biopreservatif yang aman karena dapat didegradasi oleh enzim proteolitik di lambung manusia maupun hewan (De Vuyst, 2007). Bakteriosin umumnya memiliki berat molekul kecil (Suarsana, 2001). Sensitivitas bakteriosin berbeda-beda terhadap kisaran pH dan suhu. Beberapa bakteriosin diketahui lebih toleran terhadap pH asam (Tagg, 1976) dan stabil terhadap pemanasan. Stabilitas terhadap suhu tinggi merupakan karakteristik penting bakteriosin sebagai pengawet pangan dikarenakan banyak pengolahan pangan yang melibatkan proses pemanasan.

2.5.1 Klasifikasi Bakteriosin

Klaenhammer (1993) mula-mula menetapkan pembagian bakteriosin dalam 4 kelompok. Klasifikasi ini kemudian telah direvisi dan diklasifikasikan kembali sebagai berikut (Todorov, 2009):

1. Kelas I: Lantibiotic

Kelas I adalah lantibiotik yang merupakan bakteriosin dengan peptida kecil berukuran <5 kDa (Vuyst, 1994), dengan contoh nisin dan laktisin. Cleveland *et al.*, (2007) menjelaskan bahwa bakteriosin kelas ini mengalami pascatranslasi dan dimodifikasi dengan menggabungkan non-tradisional asam amino seperti dehydroalanine, dehydrobutyrine, methyl-lanthionine dan lanthionine.

2. Kelas II

Bakteriosin kelas II merupakan bakteriosin non-lantibiotik dengan ukuran kecil (<10 kDa) dan stabil terhadap panas. Bakteriosin kelas II kemudian dibagi menjadi beberapa subkelas, yaitu bakteriosin kelas IIa, IIb, IIc dan IId. Bakteriosin kelas IIa merupakan peptida yang efektif melawan genus *Listeria*, termasuk di dalamnya adalah Pediocin dan Sakacin P. Ukuran protein yang dihasilkan antara 27 hingga 48 asam amino yang dicirikan dengan kehadiran urutan asam amino didaerah N-terminal (Mozzi, 2010). Bakteriosin kelas IIb merupakan bakteriosin yang terdiri dari dua buah peptida yang tidak termodifikasi karena mengandung dua peptida yang berbeda satu sama lain, terdapat dalam jumlah yang sama, membentuk pori pada membran sel target, dan mengganggu gradien proton dari sel target. Bakteriosin kelas IIc memiliki efek luas terhadap

permeabilitas membran dan terdiri dari satu peptida yang berbentuk siklik. Sedangkan bakteriosin kelas IId merupakan bakteriosin yang non-siklik dan tidak memiliki urutan asam amino yang serupa dengan Pediocin.

3. Kelas III

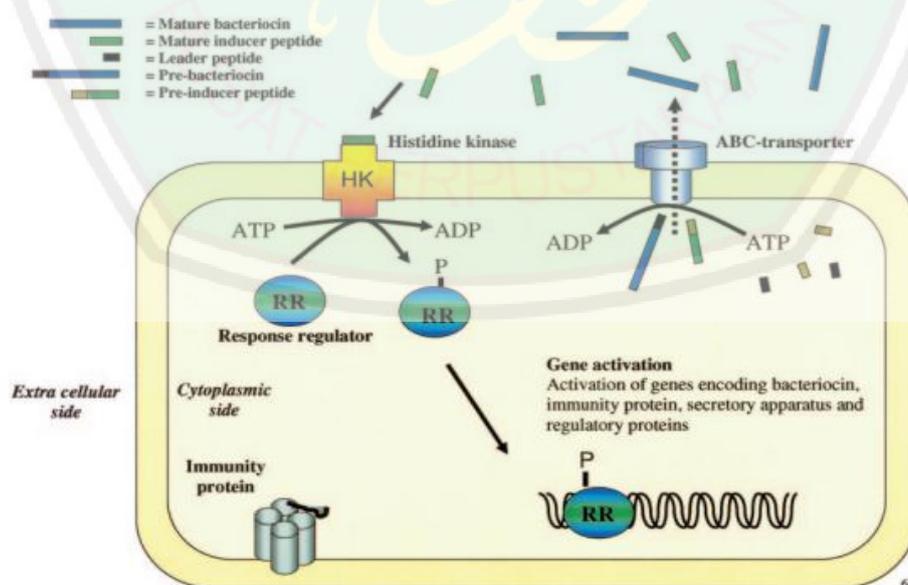
Bakteriosin yang tergolong kelas III merupakan bakteriosin non lantibiotik, berupa protein berukuran besar (>30 kDa) yang termolabil. Contoh dari bakteriosin dalam kelas ini adalah Acidofilin A dan Lactacin A.

2.5.2 Biosintesis dan Produksi Bakteriosin

Bakteriosin merupakan peptida antimikroba yang disintesis secara ribosomal. Bakteriosin disintesis selama fase eksponensial pertumbuhan sel mengikuti pola klasik sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstrakromosomal. Umumnya bakteriosin disintesis secara ribosomal, sedangkan pada kelompok lantibiotik disintesis melalui jalur ribosomal sebagai prepeptida kemudian mengalami modifikasi. Sekresi prepeptida dilakukan pada fase eksponensial dan diproduksi secara maksimal pada fase eksponensial akhir/stasioner awal (Hafsan, 2014).

Dride (2006) menjelaskan bahwa sistem yang mengatur regulasi produksi bakteriosin terdiri dari 3 gen dan dengan demikian disebut sebagai 3 komponen sistem regulator. Tiga komponen tersebut adalah (i) peptida penginduksi (peptida feromon), (ii) histidine protein kinase transmembran (reseptor feromon), dan (iii) respon regulator sitosolik.

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



Gambar 2.1. Biosintesis dan sekresi bakteriosin (Dride, 2006)

Produksi bakteriosin dipengaruhi oleh level sumber karbon, nitrogen dan fosfat yang bisa didapat melalui media. Sumber karbohidrat yang berbeda akan menghasilkan jenis bakteriosin yang berbeda pula. Nisin sebagai contoh, dapat diproduksi dari glukosa, sukrosa dan xylosa oleh *Lactococcus lactis* 10-1 (Matsuaki *et al.*, 1996). Glukosa, sukrosa dan xylosa merupakan sumber karbon terbaik dalam menghasilkan Pediosin Ach dalam media tanpa buffer (Biswas *et al.*, 1991). Holo *et al.*, (1991) menyatakan pula bahwa semua bakteriosin disintesa dengan sekuen terminal N yang fungsinya mencegah bakteriosin bersifat aktif saat masih berada dalam bakteri penghasilnya.

2.5.3 Mekanisme Kerja Bakteriosin

Secara umum, bakteriosin dari bakteri Gram positif aktif melawan terhadap jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif lainnya (Marshall, 2003). Mekanisme bakteriosin dalam melawan bakteri patogen yaitu melalui penghancuran integritas membran sitoplasma sel target dengan pembentukan pori. Bakteriosin ini akan menyebabkan kebocoran metabolit berberat molekul rendah atau pengusiran tekanan proton (*Proton Motif Force*, PMF) (Tagg *et al.*, 1995).

PMF merupakan gradien elektrokimia diatas membran sitoplasma yang terdiri atas gradien pH dan juga potensial membran. PMF bertugas memandu sintesis ATP dan mengakumulasikan ion dan metabolit lainnya. Penurunan PMF sel target, yang diinduksi oleh aktivitas dari bakteriosin akan menyebabkan kematian sel target melalui penghentian reaksi pembentukan energi. Tingkat ATP dalam intraselular akan membuat sel tidak mampu mengangkut nutrisi dan tidak mampu mempertahankan konsentrasi molekular kofaktor seperti K⁺ dan

Mg+. Hal ini menyebabkan terjadinya kematian terhadap sel (Neetles *et al.*, 1993).

Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat bersifat bakterisidal terhadap sel yang sensitif dan dapat mengalami kematian dengan sangat cepat pada konsentrasi rendah. Beberapa bakteriosin mempunyai sifat bakterisidal melawan beberapa strain dan spesies yang berhubungan dekat, tetapi beberapa dapat pula efektif melawan banyak strain dalam spesies dan genus yang berbeda. Sel yang memproduksi bakteriosin memiliki ketahanan terhadap bakteriosin yang dihasilkannya sendiri karena mendapat ketahanan protein yang spesifik. Bakteriosin ini pada umumnya sangat efektif melawan sel dari bakteri Gram positif yang lain (Ray, 2004).

2.5.4 Aplikasi Bakteriosin

Bakteriosin dapat diaplikasikan dalam makanan sebagai bahan pengawet serta penggunaan bakteriosin dalam makanan pada industri makanan dapat mengurangi penggunaan bahan pengawet kimia. Bakteriosin yang dapat digunakan dalam pengawetan makanan harus memenuhi beberapa syarat, yaitu (i) diakui sebagai zat yang aman, (ii) tidak aktif dan tidak beracun pada sel eukariotik, (iii) dapat dilemahkan oleh protease pencernaan sehingga memiliki pengaruh yang kecil pada mikrobiota usus, (iv) toleran terhadap pH dan panas, (v) memiliki aktivitas antimikroba dengan spektrum yang relatif luas terhadap bakteri patogen dan pembusuk makanan dan (vi) memiliki aktivitas yang bersifat

bakterisidal, bekerja pada membran sitoplasma bakteri dan tidak ada resistensi silang dengan antibiotik (Galvez *et al.*, 2007 dalam Jay *et al.*, 2000).

Bakteriosin dapat ditambahkan langsung ke makanan dalam bentuk kultur terkonsentrasi yang dapat berperan sebagai pengawet makanan, bahan yang memperpanjang umur simpan, bahan tambahan makanan maupun sebagai peramu. Bakteriosin dalam bentuk immobil dapat pula diaplikasikan untuk pengembangan kemasan bioaktif pada makanan seperti pada sosis (Galvez *et al.*, 2007).

2.6 Purifikasi Parsial Bakteriosin

Pemurnian berarti membebaskan suatu bahan dari bahan-bahan lain yang tidak diinginkan atau sering disebut pengotor (Channel, 1998). Chaplin dan Bucke (1990) menyatakan bahwa pemurnian protein merupakan metode yang berguna untuk pemekatan protein. Pemurnian protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain dengan perubahan pH, penambahan pelarut organik dan penambahan garam.

Pemekatan protein dengan penambahan garam ke dalam larutan protein merupakan cara yang banyak dilakukan. Garam yang dapat digunakan berupa natrium klorida, natrium sulfat atau amonium sulfat. Amonium sulfat lebih sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan garam-garam yang lain, yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai pengendapan yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya terjangkau (Scopes, 1982).

Ion garam yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein. Penambahan garam pada konsentrasi tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik molekul-molekul air dan protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menyebabkan pengendapan protein yang disebut dengan *salting out*. Protein yang hidrofobitasnya tinggi akan mengendap lebih dahulu, sedangkan protein dengan sedikit residu dan non polar kan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang lebih tinggi. Pada konsentrasi rendah, ion-ion ini akan melindungi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein melarut. Peristiwa ini disebut sebagai *salting in* (Scopes, 1982).

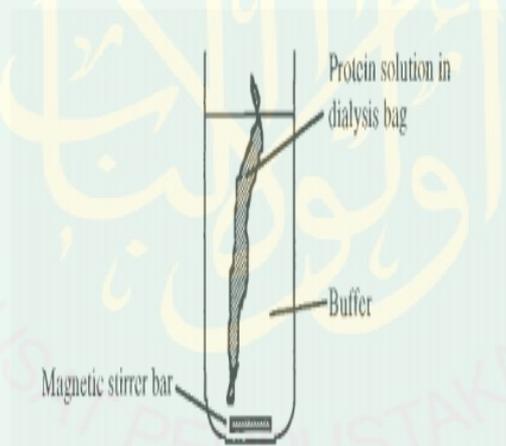
Fraksinasi menggunakan amonium sulfat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam tinggi. Amonium sulfat yang terkandung dalam protein dapat dihilangkan dengan cara dialisis.

2.7 Dialisis

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

selofan. Penggunaan kantong selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan dan memiliki harga yang relatif terjangkau (Kristanti, 2001).

Dialisis merupakan proses transport solut melalui membran, dimana solut dipindahkan antara dua cairan. Pada proses dialisis, terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul rendah dari sampel berganti dengan larutan bufer dalam dialisat. Pada waktu garam bergerak melalui pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi yang lain. Proses ini dipertahankan oleh adanya tekanan osmotik (Aulanni'am, 2005).



Gambar 2.2 Dialisis (Dennison, 2002)

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

2.8 Karakterisasi Bakteriosin

Tiga aspek penting dalam penelitian mengenai bakteriosin adalah mengenai produksi, karakterisasi dan juga purifikasi (Ogunbawo, 2003). Karakterisasi merupakan tahap yang dilakukan untuk menentukan sifat dari bakteriosin. Karakterisasi terhadap bakteriosin perlu diteliti untuk mengetahui kestabilannya dalam berbagai kondisi. Karakterisasi tersebut terdiri dari beberapa perlakuan, diantaranya yaitu perlakuan pemanasan dan ketahanan terhadap pH yang bervariasi.

Stabilitas bakteriosin terhadap pemanasan mengindikasikan bahwa bakteriosin tersebut dapat digunakan sebagai preservasi bahan pangan yang dikombinasikan dengan pengolahan menggunakan suhu tinggi untuk produk makanan (Gonzales *et al.*, 1994). Suhu yang digunakan dalam pengolahan makanan ada tiga macam, yakni suhu pasteurisasi dimana digunakan suhu sedang atau moderat berkisar 58-80°C untuk memusnahkan mikroorganisme patogen dan juga pembusuk, suhu perebusan berkisar 100°C, dan suhu sterilisasi yaitu pemanasan dengan suhu tinggi diatas 100°C untuk membunuh semua mikroorganisme pembusuk.

Dundar (2006) menyatakan bahwa resistensi terhadap panas merupakan karakteristik umum untuk berbagai jenis bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat. Bakteriosin-bakteriosin memiliki kekebalan terhadap pemanasan pada kisaran yang berbeda, mulai dari 60°C hingga 100°C selama lebih dari 30 menit (seperti pada lactocin 27, lactocin S, carnobacteriocin A) hingga tahan

terhadap pemanasan autoklaf 121°C selama 15 menit (lactacin B, lactacin F, nisin).

Masih adanya aktivitas antibakteri oleh bakteriosin ketika diberi perlakuan pemanasan diduga karena bakteriosin merupakan peptida pendek yang stabil terhadap panas. Selain itu, karena adanya asam-asam amino tertentu pada bakteriosin tersebut yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh panas Kusmarwati (2014). Najim (2012) menyebutkan bahwa stabilitas terhadap panas dapat dihubungkan dengan formasi struktur globular yang kecil dan menyebabkan kuatnya daerah hidrofobik, kestabilan ikatan silang dan kandungan sistein yang tinggi.

Selain pemanasan, faktor pH juga menentukan keamanan bahan pangan (Usmiati, 2007). Faktor pH seringkali menjadi pertimbangan bagi bahan pengawet yang akan digunakan pada bahan pangan, khususnya bagi pangan hasil peternakan dengan kondisi pH rendah seperti daging sapi, ham, bakso, susu, butter, keju dan lain-lain. Sedangkan, beberapa bakteri patogen dan pembusuk makanan seperti *E.coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat bertahan hidup pada kondisi pH yang rendah (asam).

Beberapa bakteriosin diketahui dapat stabil pada kisaran pH yang luas. Hal ini berhubungan dengan daya larut (solubilitas) bakteriosin asal bakteri asam laktat; titik isoelektrik bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat adalah sekitar 8,0-9,0. Kelarutan bakteriosin semakin menurun seiring dengan meningkatnya nilai pH (De Vuyst dan Vandamme, 1994).

2.9 Bakteri Patogen

Bakteri yang tumbuh pada bahan pangan dapat digolongkan menjadi dua jenis, yaitu bakteri pembusuk yang menyebabkan kerusakan makanan dan bakteri patogen penyebab penyakit pada manusia. Bakteri pembusuk umumnya berjumlah lebih banyak dari bakteri patogen. Bakteri patogen merupakan mikroorganisme indikator keamanan bahan pangan. Bakteri patogen terbagi menjadi 2, yaitu penyebab intoksikasi atau dapat menyebabkan keracunan karena toksin yang dihasilkan dapat berkembang dalam bahan pangan serta bakteri patogen penyebab infeksi yang menghasilkan racun didalam saluran pencernaan. Contoh dari mikroba patogen dan pembusuk yang teramati pada produk hasil fermentasi adalah dari famili *Enterobacteriaceae*, didalamnya termasuk famili *Enterobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* dan *Yersinia* (Fardiaz, 1992).

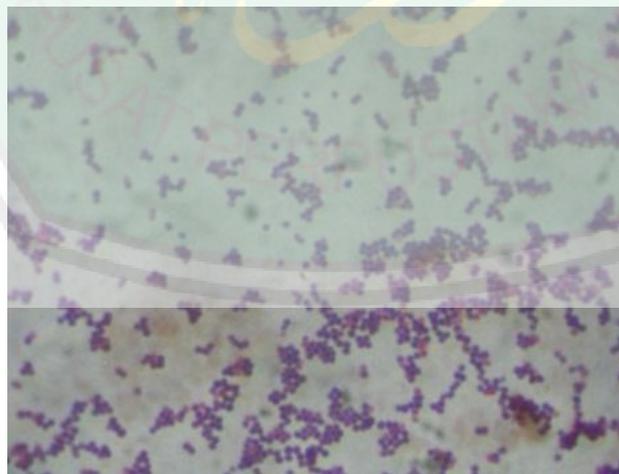
Bakteri secara umum dibedakan menjadi dua berdasarkan sifat pewarnaan Gramnya, yaitu Gram positif yang apabila diwarnai akan memberi respon warna biru keunguan dan juga Gram negatif yang memberi respon warna merah (Tortora *et al.*, 2006). Kelompok bakteri patogen yang bersifat Gram positif diantaranya adalah *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Clostridium perfringens*. Sedangkan kelompok bakteri patogen yang bersifat Gram negatif diantaranya yaitu *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*.

2.9.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri dari famili Micrococcaceae, Gram positif, berbentuk kokus yang terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan

tetrad atau berkelompok, seperti buah anggur dengan diameter $\pm 0,5-1,5 \mu\text{m}$, tidak berspora, anaerob fakultatif, tidak bergerak dan tergolong katalase positif (Holt *et al.*, 1994). Sebagian besar galur *S.aureus* bersifat patogen dan memproduksi enterotoksin yang tahan panas. Beberapa galur juga memproduksi koagulase, bersifat proteolitik, lipolitik dan β -hemolitik. *S.aureus* sering dijumpai pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat, dan saluran usus. Bakteri ini dapat menyebabkan intoksikasi dan infeksi bisul, pneumonia serta mastitis pada hewan (Fardiaz, 1992).

Temperatur tumbuh *Staphylococcus aureus* pada umumnya berkisar 7-47,8°C, dan untuk menghasilkan enterotoksin berkisar 10°C-46°C. Suhu optimum pertumbuhan *S.aureus* pada 40-45°C dan tumbuh baik pada media tanpa NaCl tetapi tetap dapat tumbuh baik pada konsentrasi NaCl 7-10%. *S.aureus* tumbuh pada kondisi pH 4,0 – 9,8 sedangkan pH optimumnya adalah 6-7 (Jay, 2000).



Gambar 2.3. *Staphylococcus aureus*

2.9.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli tergolong dalam famili Enterobacteriaceae dan termasuk bakteri Gram negatif yang berbentuk batang dan bersifat fermentatif. *E.coli* merupakan organisme inert, yaitu organisme yang tidak berbahaya namun juga tidak menguntungkan pada keadaan normal, bersifat patogen dengan tingkat bahaya sedang dan memiliki penyebaran yang cepat dalam kasus keracunan makanan. Pelczar dan Chan (2005) menjelaskan bahwa *E.coli* 0157:H7 banyak dijumpai pada daging giling dan sejenisnya. Bakteri ini dapat tumbuh dalam kisaran suhu yang luas yaitu 1-45°C, sehingga kemungkinan pangan tercemar oleh bakteri ini sangat luas.



Gambar 2.4. *Escherichia coli*

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 faktor perlakuan dan 6 kali ulangan. Faktor pertama yaitu variasi suhu pemanasan yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu (suhu ruang, 80°C, 100°C dan 121°C), faktor kedua adalah suhu penyimpanan yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu (suhu ruang, 18°C, 4°C dan -20°C), dan faktor ketiga adalah pH yang terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu (4, 5, 6 dan 7) terhadap stabilitas bakteriosin dengan ulangan sebanyak 6 kali.

3.2 Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2016 – Juli 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dalam penelitian ini dipaparkan sebagai berikut.

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi perlakuan pH (4, 5, 6 dan 7), variasi perlakuan suhu pemanasan (suhu ruang, 80°C, 100°C dan 121°C) dan variasi suhu penyimpanan (suhu ruang, 18°C, 4°C dan -20°C).

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan oleh *L.plantarum*.

3. Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini terdiri dari jenis spesies yang digunakan dan media yang digunakan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu autoclave, waterbath, inkubator, mikroskop, sentrifus, mikropipet, tip, cawan petri, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, gelas objek, refrigerator, spektrofotometer UV-Vis, ose, pH meter, jangka sorong, bunsen, timbangan, oven, *disc blank*, membran dialisis berdiameter 20, kertas saring whatman no. 1 dan vortex.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur *Lactobacillus plantarum*, bakteri indikator *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, MRSB, MRSA, NB, NA, *yeast extract*, NaOH, larutan HCl, garam amonium sulfat, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , EDTA, BaCl, BSA, Na_2CO_3 , $CuSO_4$, KNa-Tartat, Folin, dan aquades.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media

3.5.1.1 Pembuatan Media Bakteri Asam Laktat

Isolat *Lactobacillus plantarum* ditumbuhkan pada media MRSA dan MRSB. Pembuatan media dilakukan dengan menimbang MRSB 27,5 gr dan dilarutkan dalam aquades 500 ml. Seluruh media kemudian dipanaskan diatas *hotplate* hingga mendidih dan dihomogenkan menggunakan stirer. Setelah homogen, media dituang kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas yang dibungkus kasa kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.1.2 Pembuatan Media Bakteri Uji

Media NA ditimbang sebanyak 17 gr, kemudian dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 850 ml. Media NB ditimbang sebanyak 1,6 gram kemudian dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 200 ml. Semua media kemudian dipanaskan diatas *hotplate* hingga mendidih dan dihomogenkan menggunakan stirer. Setelah homogen, media dituang ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas yang dibungkus kasa dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melaksanakan penelitian, semua alat dan bahan terlebih dahulu harus di sterilisasi. Sterilisasi yang digunakan yakni sterilisasi basah. Sterilisasi basah dilakukan dengan cara perebusan menggunakan air mendidih dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.5.3 Peremajaan Kultur Bakteri

3.5.3.1 Peremajaan Kultur *Lactobacillus plantarum*

Kultur *Lactobacillus plantarum* diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada media *de Mann Rogosa sharp broth* (MRSB) 10 mL. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Nuraini, 2013).

3.5.3.2 Peremajaan Kultur Bakteri Uji

Peremajaan isolat bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

3.5.4 Pembuatan Inokulum Bakteri

3.5.4.1 Pembuatan Inokulum Bakteri *Lactobacillus plantarum*

Pembuatan inokulum dilakukan untuk menghomologkan usia bakteri. Pembuatan inokulum bakteri asam laktat, dilakukan dengan mengambil 15ml isolat bakteri asam laktat dan diinokulasikan pada 150 ml media MRS *broth*, diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm dengan temperatur 37°C selama 24 jam.

3.5.4.2 Pembuatan Inokulum Bakteri Uji

Bakteri uji *E.coli* dan *S. aureus* diinokulasikan sebanyak 1 ose isolat ke dalam masing-masing 100 ml media *nutrient broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *L. plantarum*

Pembuatan kurva pertumbuhan *L. plantarum* dilakukan untuk mengetahui waktu yang optimal isolat tersebut dalam menghasilkan bakteriosin. Pembuatan kurva dilakukan dengan menginokulasikan isolat *L. Plantarum* sebanyak 1 ml pada media MRS *broth* dan setiap 3 jam sekali selama 24 jam diukur *optical density* (OD)nya menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 600$ nm. (Jati, 2012).

3.5.6 Produksi Bakteriosin

Inokulum *Lactobacillus plantarum* diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam 500 ml media MRSB yang telah ditambah *yeast extract* 3% (b/v), kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 37⁰C dan kecepatan 120 rpm selama 12 jam. Filtrat hasil fermentasi dipisahkan dari endapan selnya dengan disentrifugasi pada 8500 rpm, 4⁰C selama 25 menit. Setelah selesai, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring Whatman no.1 dan selanjutnya filtrat bebas sel dinetralkan dengan NaOH 1N sampai pH 6. Semua tahapan proses ini dilakukan pada suhu dingin 4⁰C. Filtrat hasil fermentasi tersebut merupakan ekstrak kasar bakteriosin yang akan dipakai untuk penelitian berikutnya (Harianie, 2013).

3.5.7 Purifikasi Parsial dengan Presipitasi Amonium Sulfat

Purifikasi (pemurnian) parsial bakteriosin dilakukan pada supernatan antimikroba netral yang berasal dari *L.plantarum*. Serbuk amonium sulfat ditambahkan secara bertahap dengan konsentrasi 60% sebanyak 258 gram ke

dalam supernatan antimikroba netral untuk mendapatkan endapan protein, kemudian dihomogenkan secara perlahan menggunakan *stirrer* pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu supernatan dipindahkan ke tabung sentrifus, kemudian dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, supernatan dibuang dan didapatkan presipitat bakteriosin. Presipitat bakteriosin kasar tersebut kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat 0,2 M pH netral (perbandingan 1:1), dikoleksi ke dalam wadah kaca dan diukur konsentrasi proteinnya (Ogunbawo, 2003).

3.5.8 Dialisis

Dialisis dilakukan dengan tujuan untuk *desalting* atau menghilangkan garam amonium sulfat yang masih bercampur dengan presipitat bakteriosin kasar. Proses ini dilakukan menggunakan buffer kalium fosfat (*potassium phosphate*). Buffer kalium fosfat dibuat dengan mencampurkan KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 (Lampiran 1.2) dan memiliki pH 6,8. Dialisis dilakukan dengan memasukkan membran dialisis yang telah diisi dengan presipitat bakteriosin kasar yang telah ditambahkan dengan buffer fosfat 0,2 M ke dalam buffer kalium fosfat 0,01M. Proses tersebut dilakukan di atas *stirrer* pada suhu 4°C, dan dilakukan penggantian buffer sebanyak 2 kali (jam ke 2 dan jam ke 4), selanjutnya dilakukan penggantian setiap 6 jam sekali. Dialisis dihentikan jika semua garam amonium sulfat telah keluar dari membran dengan mengujinya menggunakan larutan BaCl_2 . Beberapa tetes larutan BaCl_2 ditambahkan dalam 2 ml larutan buffer di luar

membran. Dialisis dihentikan apabila setelah ditetesi BaCl_2 tidak ada endapan putih yang terbentuk.

Hasil dari proses ini yaitu didapatkan ekstrak bakteriosin. Bakteriosin selanjutnya diukur konsentrasinya dan dilakukan uji antagonistik (Jati, 2012). Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 660$ nm.

3.5.9 Pengukuran Konsentrasi Protein

3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; dan 0,12 mg/ml dalam 10 ml aquades. Kemudian dipipet masing-masing sebanyak 1 ml dan ditambahkan 5 ml reagen Lowry C (Lampiran 1.1), dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 ml reagen Lowry D dan dihomogenkan kembali dengan vortex dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Diukur absorbansi masing-masing larutan dengan spektrofotometer pada λ 660 nm (Trinanda, 2015).

3.5.9.2 Pengukuran Konsentrasi Protein Sampel

Sampel bakteriosin diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml. Campuran larutan ini kemudian divortex agar homogen. Dengan demikian maka sampel mengalami pengenceran 10x.

Selanjutnya dari larutan yang telah diencerkan, diambil 1 ml dan ditambahkan 5 ml reagen Lowry C, dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu dan dihomogenkan kembali dengan vortex dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Kompleks berwarna yang terbentuk selanjutnya siap diukur absorbansinya pada λ 660 nm (Trinanda, 2015).

3.5.10 Uji Antagonistik Bakteriosin pada Mikroba Patogen

Metode yang digunakan dalam uji antagonistik ini adalah metode cakram modifikasi dari Yulinery (2015). Sebanyak 100 μ l masing-masing kultur bakteri indikator yang kekeruhannya setara dengan 10^6 cfu/ml disebar pada media NA, kemudian diratakan. *Disc blank* yang telah steril direndam selama 30 menit dalam supernatan atau ekstrak bakteriosin, lalu diletakkan pada cawan yang telah berisi media dan bakteri indikator. Cawan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Aktivitas daya hambat ekstrak bakteriosin terhadap pertumbuhan bakteri uji ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar *paper disc*. Semakin luas zona hambat, maka semakin besar aktivitas antibakterinya. Hasil dari zona hambat dikoreksi dengan kontrol yaitu ukuran diameter kertas uji (0,6 cm). Zona bening maupun warna semu menunjukkan bahwa bakteriosin berperan dalam membunuh maupun menghambat aktivitas bakteri indikator. Sapatnekar *et al.* (2010) menyatakan bahwa, hasil dari uji antagonistik adalah zona hambat (*clear and*

distinct zone of inhibition) yang menunjukkan bahwa terdapat aktivitas antimikroba yang melakukan penghambatan terhadap bakteri indikator.

3.5.11 Karakterisasi Bakteriosin

3.5.11.1 Pengaruh Suhu Pemanasan terhadap Stabilitas Bakteriosin

Bakteriosin diuji ketahanannya terhadap empat suhu pemanasan modifikasi dari (Abo-Amer, 2007; Ivanova *et al.*, 2000) yaitu 1) suhu ruang selama 30 menit, 2) suhu 100°C sebagai representasi suhu perebusan, 3) suhu pasteurisasi, yakni pemanasan dengan suhu 80 °C selama 30 menit dan 4) suhu sterilisasi, yakni pemanasan dengan suhu 121°C selama 15 menit sebagai representasi pengolahan daging dalam kaleng. Bakteriosin yang telah diberi perlakuan pemanasan kemudian dilakukan uji antagonistik terhadap bakteri indikator sesuai dengan prosedur sebelumnya.

3.5.11.2 Pengaruh Suhu Penyimpanan terhadap Stabilitas Bakteriosin

Uji ketahanan terhadap suhu penyimpanan dilakukan untuk mengetahui stabilitas bakteriosin pada suhu dingin dengan lama penyimpanan 1 minggu. Bakteriosin diuji ketahanannya terhadap berbagai suhu dingin (suhu ruang, suhu 18°C, suhu 4°C dan suhu -20°C). Ketahanan terhadap suhu penyimpanan dilihat dengan menguji aktivitas antimikroba bakteriosin murni hasil perlakuan tersebut terhadap bakteri indikator sesuai dengan prosedur sebelumnya.

3.5.11.3 Pengaruh pH terhadap Stabilitas Bakteriosin

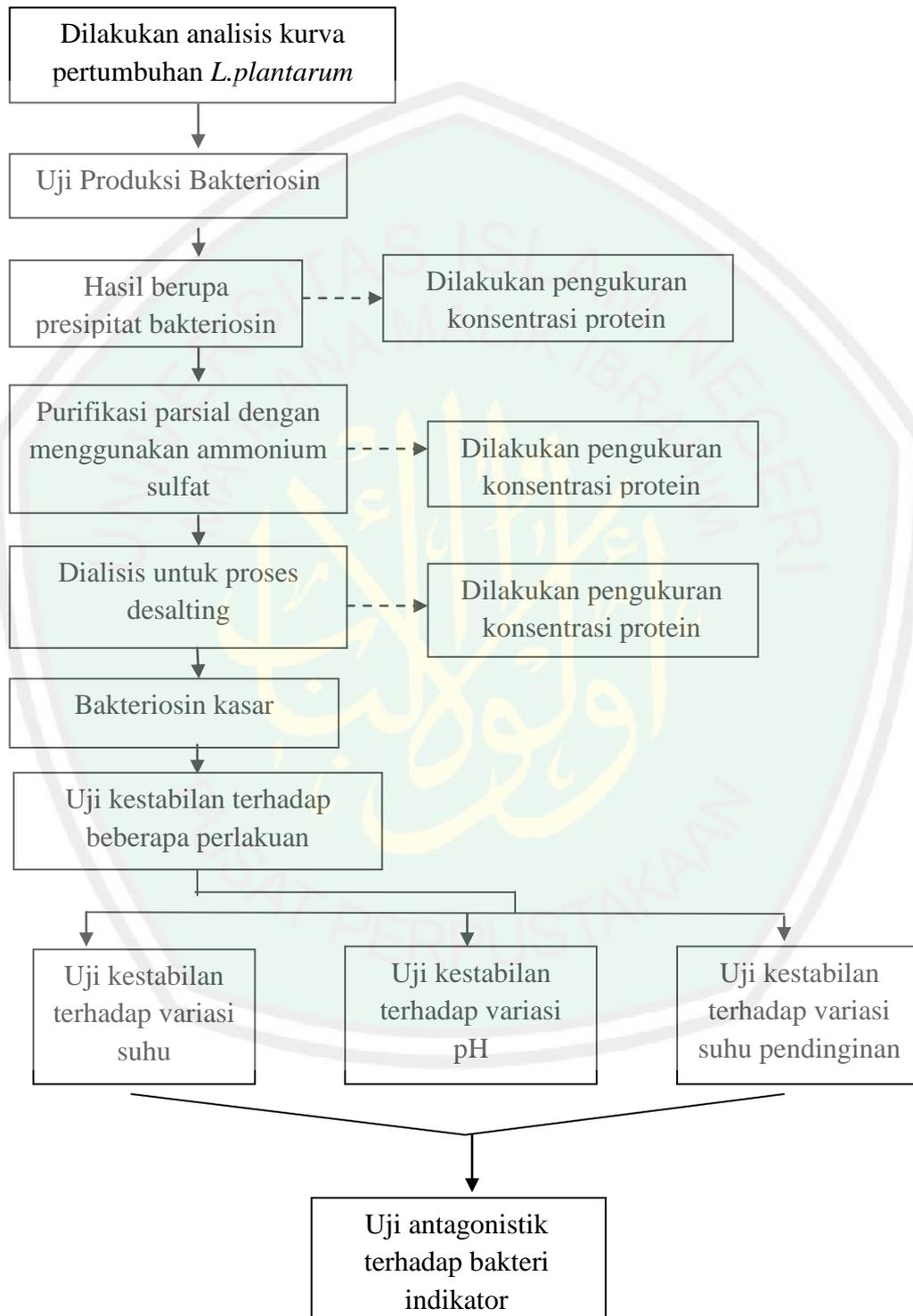
Bakteriosin diuji ketahanannya terhadap berbagai nilai pH (4, 5, 6 dan 7) dengan menambahkan HCl 1N dan NaOH 1N. Setelah pengaturan pH, bakteriosin

kemudian diinkubasi selama 4 jam pada suhu kamar. Ketahanan terhadap pH dilihat dengan menguji aktivitas antimikroba bakteriosin murni hasil perlakuan pH tersebut terhadap bakteri indikator sesuai dengan prosedur sebelumnya (Hata *et al.*, 2010).

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran konsentrasi protein dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data diameter zona hambat dianalisis dengan menggunakan Anova *One Way* dan apabila terdapat pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan.

3.7 Alur Penelitian



BAB IV

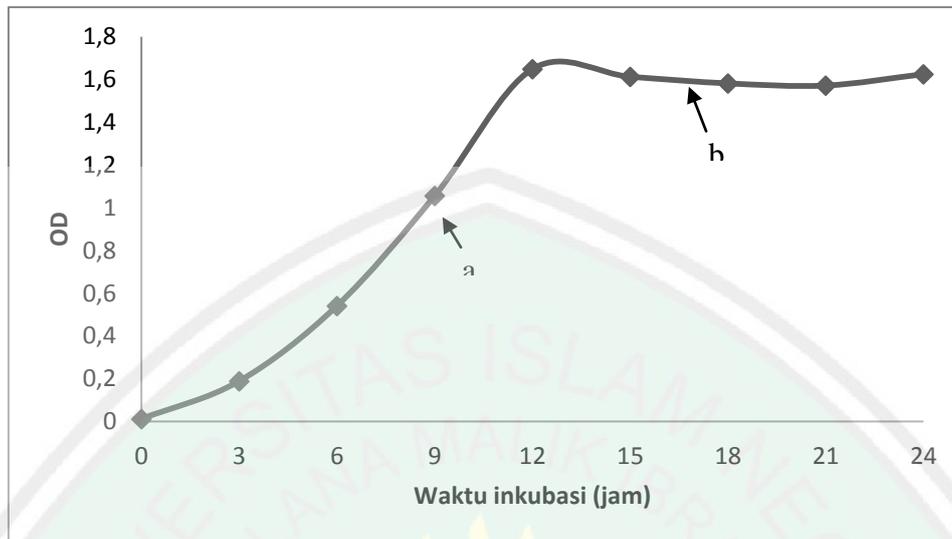
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020

Pembuatan kurva pertumbuhan *L. plantarum* FNCC 0020 bertujuan untuk mengetahui proses pertumbuhan bakteri sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan waktu optimum isolat *L. plantarum* dalam menghasilkan senyawa antimikroba. Selain itu, kurva pertumbuhan juga dapat digunakan untuk menentukan lamanya waktu inkubasi yang dibutuhkan isolat *L. plantarum* selama proses produksi suatu metabolit sekunder.

Kurva pertumbuhan menunjukkan siklus hidup dari bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari peningkatan massa atau jumlah sel total. Pelczar (2007) menyebutkan bahwa istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada perubahan dalam hasil panen (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme.

Vanadianingrum (2008) menyebutkan bahwa selama masa pertumbuhan, pertambahan massa organisme berbanding lurus dengan pertambahan komponen seluler seperti DNA, RNA dan protein. Kurva pertumbuhan isolat *L. plantarum* FNCC 0020 selama 24 jam menunjukkan adanya 2 fase pertumbuhan, yakni fase logaritmik dan fase stasioner. Fase kematian belum terjadi selama 24 jam waktu inkubasi. Hasil analisis kurva pertumbuhan isolat *L. plantarum* FNCC 0020 disajikan dalam gambar 4.1.



Keterangan: a. Fase logaritmik b. Fase stasioner

Gambar 4.1. Kurva Pertumbuhan isolat *L. plantarum* FNCC 0020 selama 24 jam.

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa selama 24 jam inkubasi, isolat *L. plantarum* FNCC 0020 mengalami 2 fase pertumbuhan, yang pertama yaitu fase logaritmik (eksponensial) terjadi selama kurang lebih 9 jam, mulai terdeteksi pada jam ke-3 hingga jam ke-12 waktu inkubasi. Fase ini dicirikan dengan adanya pertumbuhan signifikan pada sel-sel bakteri, dimana pada kurva terlihat bahwa nilai ODnya naik secara signifikan dari 0,20 ke 0,50 dan meningkat hingga 1,60. Reiny (2012) menyatakan bahwa fase logaritmik menggambarkan sel membelah diri dengan laju yang konstan, massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama, aktivitas metabolisme konstan, serta keadaan pertumbuhan seimbang.

Fase selanjutnya yakni fase tetap (stasioner) yang terjadi pada jam ke 12-24 waktu inkubasi. Fase ini ditandai dengan pertumbuhan yang konstan antara bakteri yang hidup dan yang mati. Pada kurva terlihat bahwa pada jam ke 12-24 ini nilai OD bakteri stabil di angka 1,60. Reiny (2012) menyebutkan bahwa fase

stasioner menggambarkan terjadinya penumpukan metabolit hasil aktivitas metabolisme sel dan kandungan nutrisi mulai habis. Akibatnya, akan terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi sehingga beberapa sel mati dan lainnya akan tetap tumbuh sehingga jumlah sel menjadi relatif konstan.

Produksi optimal bakteriosin terjadi pada fase logaritmik akhir. Boe (1996) menyebutkan bahwa metabolit lain yang diproduksi selama BAL tumbuh adalah bakteriosin yang merupakan metabolit sekunder. Meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner. Schnell (1998) menjelaskan pula bahwa sintesis bakteriosin oleh bakteri asam laktat terjadi selama pertumbuhan fase eksponensial mengikuti pola sintesis protein. Hal ini sebagaimana yang dilaporkan Khoiriyah (2014) bahwa bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. mulai terdeteksi pada awal fase eksponensial dan mencapai optimal pada awal fase stasioner. Ogunbawo (2003) melaporkan hal yang serupa, bahwa produksi optimum bakteriosin dari *L. brevis* OG1 menunjukkan aktivitas antimikroba pada awalnya terdeteksi pada fase pertumbuhan eksponensial dan mencapai maksimum pada awal fase stasioner. Fase eksponensial dari *L. plantarum* FNCC 0020 mencapai puncak setelah 12 jam inkubasi. Awal fase stasionernya dimulai dari jam ke 12, sehingga produksi bakteriosin dari *L. plantarum* FNCC 0020 dapat dilakukan dengan lama inkubasi 12 jam.

4.2 Produksi dan Purifikasi Bakteriosin

4.2.1 Produksi Bakteriosin

Proses produksi bakteriosin diawali dengan menginokulasikan isolat *L. plantarum* FNCC 0020 dalam media MRS broth yang diberi *inducer* berupa *yeast extract* 3%. MRSB memiliki kandungan nutrisi yang lengkap untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Kusmiati (2002) melaporkan bahwa media MRS merupakan media terbaik untuk pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Leuconostoc mesenteroides*.

Inducer yang digunakan yaitu *yeast extract*. *Yeast extract* ditambahkan sebanyak 3% dalam media produksi. *Yeast extract* merupakan *inducer* hasil ekstrak khamir yang banyak mengandung nitrogen. Ooi (2015) melaporkan bahwa *yeast extract* diketahui sebagai sumber nitrogen terbaik untuk produksi bakteriosin asal *L. plantarum* I-UL4. Aktivitas bakteriosin tertinggi diperoleh dengan penambahan *yeast extract* sebesar 3% dalam media MRS. Matsuaki *et al.* (1996) menyebutkan bahwa produksi bakteriosin dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen dan fosfat yang bisa diperoleh dari media.

Proses produksi selanjutnya dilakukan selama 12 jam inkubasi (sesuai hasil kurva pertumbuhan) dengan suhu 37°C. Rawal (2013) menyebutkan bahwa suhu 37°C merupakan temperatur yang optimum untuk produksi bakteriosin oleh spesies *Lactobacillus*. Aktivitas bakteriosin pada temperatur ini lebih besar dibandingkan pada suhu 30°C maupun suhu ruang.

Suspensi bakteri hasil produksi selanjutnya dipisahkan dari ekstrak kasar bakteriosin dengan cara sentrifugasi dingin pada suhu 4°C selama 20 menit

dengan kecepatan 10.000 rpm. Sentrifugasi dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya denaturasi protein akibat suhu yang terlalu tinggi. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian disaring dan diukur nilai pHnya.

pH supernatan bebas sel hasil sentrifugasi berada pada kisaran pH asam yaitu sebesar 4,09. Kondisi pH asam ini disebabkan oleh adanya asam-asam organik yang terbentuk sebagai hasil fermentasi utama dari bakteri asam laktat. Syahniar (2009) memaparkan bahwa semakin rendah pH supernatan bebas sel, menandakan semakin banyak pula asam organik yang terkandung didalamnya. Smid dan Gorris (2007) menambahkan bahwa asam-asam organik tersebut mempunyai spektrum penghambatan yang luas terhadap mikroorganisme lain dengan cara menyerang membran sel, dinding sel, sistem sintesis protein, metabolisme enzim maupun secara genetik.

Asam-asam organik yang terkandung dalam supernatan bebas sel dapat menutupi aktivitas bakteriosin dalam menghambat bakteri indikator pada uji antagonistik. Untuk itu, asam-asam organik ini perlu dihilangkan dengan cara dilakukan penetralan menggunakan NaOH 1N. Penetralan asam laktat dengan NaOH menghasilkan air yang bersifat netral, dengan reaksi sebagai berikut.



4.1 Reaksi penetralan asam laktat dengan penambahan NaOH

Penambahan NaOH 1N ini dilakukan untuk mengurangi pengaruh asam organik yang terdapat dalam supernatan, sehingga dapat dipastikan bahwa

aktivitas penghambatan yang dihasilkan berasal dari senyawa antimikroba yang dimiliki oleh supernatan netral. Hasil penambahan NaOH dalam supernatan bebas sel menunjukkan nilai pH yang meningkat menjadi 6,12. Hata *et al.* (2010) menambahkan bahwa pH yang optimal untuk aktivitas penghambatan oleh bakteriosin berkisar antara 5,8-6,2 dimana bakteriosin mampu melakukan penghambatan terhadap bakteri patogen sebesar 90 – 100%.

Hasil uji antagonistik supernatan bebas sel netral asal *L. plantarum* FNCC 0020 dari media produksi bakteriosin terhadap bakteri indikator disajikan pada tabel 4.1. Kemampuan penghambatan supernatan netral asal *L. plantarum* terhadap bakteri indikator ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram.

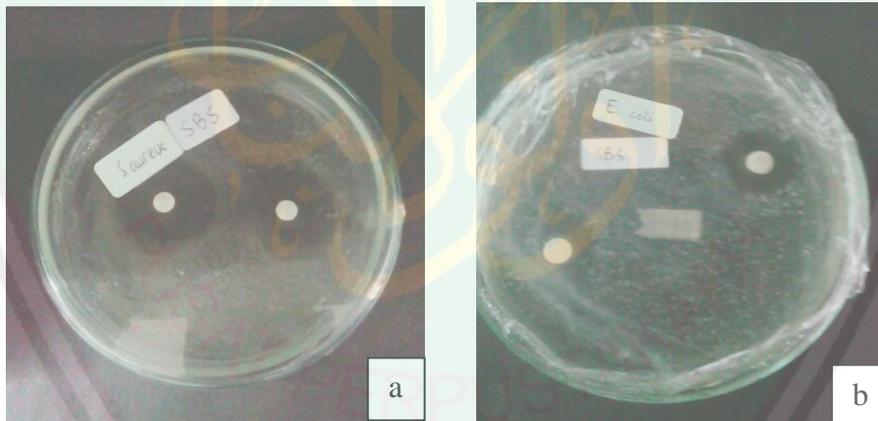
Tabel 4.1. Hasil Uji Antagonistik Supernatan Netral terhadap Bakteri Indikator

Bakteri indikator	d zona hambat (mm)	Rasio*
<i>Escherichia coli</i>	6,32	Kuat
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,57	Kuat

*Keterangan : d = diameter. Diameter zona hambat 0 - 3 mm = lemah; 3 – 6 mm = sedang; >6 mm = kuat (Pan, 2009).

Berdasarkan data pada tabel 4.1, diketahui bahwa diameter zona hambat supernatan netral terhadap bakteri *E.coli* sebesar 6,32 mm dan terhadap bakteri *S.aureus* sebesar 9,57 mm. Menurut Pan (2009) diameter zona hambat dengan nilai >6mm termasuk dalam kategori kuat. Supernatan yang telah dinetralkan menyebabkan hilangnya pengaruh asam organik yang terkandung dalam supernatan bebas sel, sehingga aktivitas antimikroba yang dihasilkan supernatan netral tidak akan sebesar aktivitas antimikroba supernatan bebas sel.

Diameter penghambatan supernatan netral terhadap bakteri *S.aureus* lebih besar bila dibandingkan terhadap *E.coli*. Hal ini dikarenakan struktur penyusun dinding sel bakteri gram positif dan negatif yang berbeda. Bakteri gram positif seperti *S. aureus* hanya mempunyai membran plasma tunggal dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sekitar 90% dari dinding sel tersebut tersusun atas peptidoglikan, sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asam teikhoat. Sedangkan, bakteri gram negatif memiliki sistem membran ganda dimana membran plasmanya diselimuti oleh membran luar yang permeabel. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel tebal yang berupa peptidoglikan yang terletak diantara membran dalam dan membran luarnya (Pelczar, 1988).



Gambar 4.2 Aktivitas penghambatan SBS terhadap bakteri (a) *Staphylococcus aureus* dan (b) *Escherichia coli*.

Dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dan berlapis serta tidak mengandung asam teikoat sebagai salah satu reseptor bakteriosin sehingga lebih resisten. Selain itu adanya perlindungan membran luar yang membentuk lapisan terluar dari selubung sel yang berfungsi sebagai penghalang (*barrier*) efisien melawan larutan hidrofobik tertentu (Olasupo, 2003).

4.3.2 Purifikasi Parsial dengan Amonium Sulfat dan Dialisis

Tahapan purifikasi SBS yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi purifikasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Hasil dari proses purifikasi ini selanjutnya disebut sebagai bakteriosin murni. Proses purifikasi parsial ini dilakukan dengan menambahkan serbuk amonium sulfat kedalam larutan supernatan netral. Prinsip metode pengendapan amonium sulfat ini didasarkan pada efek *salting out*, yaitu penambahan garam tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun.

Penggunaan amonium sulfat sebagai garam yang ditambahkan dalam supernatan netral ini dikarenakan amonium sulfat memiliki beberapa kelebihan. Keuntungan menggunakan amonium sulfat bila dibandingkan pelarut yang lainnya, diantaranya yaitu kelarutannya tinggi, tidak toksik terhadap kebanyakan enzim, murah dan dapat meningkatkan stabilitas enzim tanpa mempengaruhi struktur proteinnya (Suhartono, 1992).

Pemurnian supernatan netral dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat kedalam supernatan netral sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Semua proses dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya denaturasi protein oleh suhu yang terlalu tinggi. Amonium sulfat ditambahkan hingga kejenuhannya mencapai 60% yaitu sebanyak 258 gram. Campuran larutan ini selanjutnya didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C untuk memaksimalkan proses pengendapan.

Penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah menyebabkan kelarutan protein akan meningkat. Hal ini dikarenakan ion

anorganik yang terhidrasi sempurna akan mengikat permukaan protein dan mencegah penggabungan (agregasi) molekul protein. Peristiwa ini disebut sebagai *salting in*. Suhartono (1992) menjelaskan bahwa pada konsentrasi yang rendah, ion-ion akan melingkungi molekul-molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein akan melarut. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Bila konsentrasi garam terus ditingkatkan, maka kelarutan protein akan turun.

Penambahan garam pada konsentrasi tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik molekul-molekul air dan protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi menyebabkan pengendapan protein yang disebut *salting out* (Scope, 1982).

Endapan yang diperoleh kemudian dimurnikan kembali dengan dialisis. Proses dialisis dilakukan untuk menghilangkan molekul garam amonium sulfat sisa pengendapan serta molekul pengganggu lainnya. Molekul zat terlarut akan berpindah dari larutan dengan konsentrasi tinggi ke larutan dengan konsentrasi rendah. Pada awal proses dialisis, konsentrasi larutan dalam membran dialisis akan lebih tinggi daripada diluar membran. Hal ini menyebabkan molekul-molekul yang berukuran kecil akan keluar melewati pori-pori membran, sedangkan molekul-molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan di dalam membran. Amonium sulfat akan keluar melewati membran dialisis, sedangkan bakteriosin (berat molekul <10 kDa) dan enzim-enzim yang dihasilkan oleh BAL (seperti protease dengan berat molekul <46 kDa) akan tetap berada dalam kantong

dialisis. Selain itu, konsentrasi garam di dalam kantong yang lebih tinggi juga akan menyebabkan larutan buffer masuk ke dalam membran. Peristiwa ini terjadi hingga tercapai kondisi kesetimbangan antara larutan didalam membran dengan larutan diluar membran.

Dialisis dilakukan dengan melarutkan endapan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dengan buffer fosfat 0,2 M pH 6,8. Penambahan buffer ini bertujuan untuk melarutkan dan menjaga kestabilan protein bakteriosin. Campuran larutan ini kemudian dimasukkan kedalam membran dialisis. Selanjutnya, membran direndam dalam larutan buffer fosfat dengan konsentrasi 0,05 M pH 6,8. Dialisis dilakukan pada suhu dingin untuk mencegah terjadinya penurunan kestabilan protein bakteriosin. Selain itu pada proses dialisis juga disertai dengan pengadukan kecepatan rendah menggunakan *magnetic stirer* untuk mempermudah keluarnya molekul berukuran kecil dari membran dialisis.

Selama proses dialisis, buffer fosfat perlu diganti pada saat larutan didalam kantong dan diluar kantong telah mencapai kesetimbangan. Dengan penggantian buffer ini, maka proses difusi akan terus berjalan. Pengecekan dengan menggunakan larutan BaCl_2 1M dilakukan untuk mengetahui larutan protein telah bebas dari garam amonium sulfat. Buffer diluar membran diambil beberapa ml dan ditetesi dengan HCl. Campuran ini kemudian ditetesi dengan BaCl_2 1M. Amonium sulfat akan bereaksi dengan BaCl_2 menghasilkan endapan putih BaSO_4 . Proses dialisis dihentikan saat penambahan BaCl_2 dalam larutan buffer tidak lagi menghasilkan endapan putih.

Pada proses dialisis ini, penggantian buffer dilakukan sebanyak 4 kali hingga benar-benar tidak ada endapan putih yang timbul setelah buffer ditetesi dengan BaCl_2 . Setelah proses dialisis selesai, membran kemudian diangkat dari buffer. Larutan bakteriosin murni yang terdapat dalam membran selanjutnya dipindahkan dalam botol kaca steril untuk disimpan.

4.2.3 Pengukuran Konsentrasi Protein Bakteriosin Hasil Pemurnian

Bakteriosin murni yang diperoleh dari tahapan purifikasi selanjutnya diukur konsentrasinya. Pengujian protein dilakukan menggunakan metode Lowry. Konsentrasi protein ditentukan dengan membuat kurva standar protein yang berfungsi untuk mengetahui konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Bovine Serum Albumin (BSA) dipilih sebagai larutan untuk pembuatan kurva standar. Pengukuran konsentrasi protein selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang 660 nm. Pierce (2005) menyebutkan bahwa pada metode Lowry, pembacaan dapat dilakukan pada rentang 650 nm sampai 750 nm, namun penyerapan optimum terjadi pada panjang gelombang 660 nm.

Hasil dari tahapan purifikasi menggunakan amonium sulfat disebut sebagai presipitat bakteriosin dan hasil dari proses dialisis disebut sebagai bakteriosin murni. Pengujian konsentrasi protein ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi protein mulai dari tahapan supernatan bebas sel, presipitat bakteriosin hingga bakteriosin murni, sehingga dapat dilihat perbedaan konsentrasi protein dari ketiga bentuk bakteriosin tersebut. Hasil pengukuran konsentrasi protein dari ketiga tahapan tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Konsentrasi Protein Bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020

Sampel	Volume (ml)	Konsentrasi Protein($\mu\text{g/ml}$)
Supernatan bebas sel netral	495	1060
Presipitat bakteriosin	13	738,57
Bakteriosin murni	16	352,86

Berdasarkan tabel 4.2 di atas, dapat dikatakan bahwa konsentrasi protein pada supernatan bebas sel netral dan presipitat bakteriosin lebih tinggi dibandingkan pada bakteriosin murni. Supernatan bebas sel dan presipitat bakteriosin mempunyai nilai konsentrasi protein yang lebih tinggi dikarenakan dimungkinkan masih terdapat campuran dari suspensi bakteri. Selain itu, Bariyah (2012) menjelaskan bahwa konsentrasi protein yang dihasilkan oleh plantarisin kasar tidak hanya berasal dari plantarisin namun ada penghasil protein lain yaitu masih adanya pengaruh dari media MRSB yang memiliki kandungan pepton dan *yeast extract* yang tinggi.

Penurunan konsentrasi protein terjadi setelah melalui proses dialisis. Proses dialisis ini dilakukan untuk memisahkan garam amonium sulfat yang tersisa dari proses pengendapan. Tabel 4.2 menunjukkan pula bahwa terjadi peningkatan volume setelah dialisis selesai. Hal ini menunjukkan terjadinya proses pengenceran volume bakteriosin. Proses pengenceran ini menyebabkan menurunnya kadar protein apabila dibandingkan dengan presipitat bakteriosin.

Konsentrasi protein yang dihasilkan *L. plantarum* FNCC 0020 ini adalah sebesar 352,86 $\mu\text{g/ml}$. Elfrida (2014) melaporkan bahwa konsentrasi protein dari bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* IIA-IA5 adalah sebesar 76,53 $\mu\text{g/ml}$, bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* F1 sebesar 75 $\mu\text{g/ml}$ (Ogunbawo, 2003),

plantarisin asal LR14 sebesar 59,21 µg/ml (Tiwari dan Srivasta, 2008), serta bakteriosin asal *Lactobacillus lactis* sebesar 320 µg/ml (Saraiva, 2014). Hal ini membuktikan bahwa perbedaan spesies dan strain *Lactobacillus* mempengaruhi karakteristik plantarisin yang dihasilkan (Saenz *et al.*, 2009).

4.3 Karakterisasi Bakteriosin

4.3.1 Stabilitas Bakteriosin terhadap Pemanasan

Aktivitas penghambatan bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 diamati untuk mengetahui stabilitas bakteriosinnya terhadap perlakuan pemanasan. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa besar zona hambat terhadap bakteri *E. coli* tidak berbeda nyata, yang artinya tidak ada pengaruh perlakuan pemanasan terhadap daya hambat bakteriosin. Nilai diameter zona hambat bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 terhadap bakteri indikator *E. coli* dan *S.aureus* disajikan pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Pengaruh Variasi Suhu Pemanasan terhadap Diameter Zona Hambat (mm) Bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 pada Bakteri Indikator

Perlakuan	Bakteri Indikator	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Suhu ruang	3,71	4,01
80°C	3,53	4,19
100°C	3,41	3,96
121°C	3,51	3,63

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa diameter penghambatan bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 tidak jauh berbeda antara yang tidak mendapat perlakuan pemanasan dengan yang dipanaskan pada beberapa suhu berbeda. Hasil analisis ragam menunjukkan nilai signifikansi > 0,05 yang berarti tidak

terdapat pengaruh suhu pemanasan terhadap zona hambat yang dihasilkan bakteriosin.

Bakteriosin asal *L. brevis* OG1 dilaporkan stabil setelah pemanasan 121°C selama 60 menit dan *L. plantarum* F1 yang stabil setelah pemanasan suhu 121°C selama 10 menit. Sedangkan Villani *et al.* (2001) melaporkan bahwa aktivitas antimikroba *Lactococcus garvieae* L-1 benar-benar hilang setelah inkubasi pada 121°C selama 15 menit, Kout (2016) menyebutkan bahwa aktivitas antimikroba bakteriosin asal *Enterococcus* sp. GHB26 hilang sebesar 50% setelah pemanasan 120°C, Sankar (2012) melaporkan pula bahwa aktivitas antimikroba *L. plantarum* hasil isolasi dari susu sapi turun hingga 80% setelah pemanasan suhu 121°C. Sedangkan bakteriosin yang dihasilkan *L. plantarum* FNCC 0020 memiliki sifat stabil terhadap pemanasan hingga suhu 121°C selama 15 menit.

Perbedaan stabilitas bakteriosin ini mengindikasikan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh setiap bakteri-bakteri asam laktat ini memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Hal ini membuktikan bahwa perbedaan strain *Lactobacillus plantarum* akan mempengaruhi karakteristik plantarisin yang dihasilkan (Saenz *et al.*, 2009).

Dundar (2006) menyatakan bahwa resistensi terhadap panas merupakan karakteristik umum untuk berbagai jenis bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat. Bakteriosin-bakteriosin memiliki kekebalan terhadap pemanasan pada kisaran yang berbeda, mulai dari 60°C hingga 100°C selama lebih dari 30 menit (seperti pada lactocin 27, lactocin S, carnobacteriocin A) hingga tahan

terhadap pemanasan autoklaf 121°C selama 15 menit (lactacin B, lactacin F, nisin).

Perubahan suhu dan pH dapat mengurangi aktivitas biokimia protein (Poedjiadi, 2006). Kusmarwati (2014) menjelaskan bahwa masih adanya aktivitas antibakteri oleh bakteriosin ketika diberi perlakuan pemanasan diduga karena bakteriosin merupakan peptida pendek yang stabil terhadap panas. Selain itu, karena adanya asam-asam amino tertentu pada bakteriosin tersebut yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh panas. Najim (2012) menyebutkan bahwa stabilitas terhadap panas dapat dihubungkan dengan formasi struktur globular yang kecil dan menyebabkan kuatnya daerah hidrofobik, kestabilan ikatan silang dan kandungan sistein yang tinggi. De Vuyst (1994) juga menambahkan bahwa sebagian besar bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat merupakan bakteriosin dari kelas I dan II, dideskripsikan sebagai protein yang memiliki ikatan hidrofobik dengan struktur tersier, yang menyebabkan adanya sifat kestabilan terhadap pemanasan. Kestabilan terhadap pemanasan ini merupakan suatu keuntungan dan merupakan parameter yang sangat penting jika bakteriosin akan diaplikasikan sebagai pengawet makanan sebab prosedur-prosedur pemrosesan makanan banyak melibatkan pemanasan.

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa bakteriosin dari *L. plantarum* FNCC 0020 yang telah diberi perlakuan pemanasan mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 3,41 – 3,71 mm dan *S. aureus* sebesar 3,63 - 4,19 mm. Berdasarkan Pan (2009), nilai penghambatan sebesar 3-6 mm tergolong dalam kategori sedang. Hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas penghambatan bakteriosin efektif terhadap

bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Hal serupa dilaporkan pula oleh Nugrahani (2013) bahwa bakteriosin asal *L. lactis* yang telah diberi perlakuan pemanasan hingga suhu 95°C mampu melakukan penghambatan terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Micrococcus* sp. dengan nilai diameter penghambatan sebesar 0,54 – 2,30 mm dan 0,75 – 3,75 mm; Noordiana (2013) juga menyatakan bahwa bakteriosin hasil isolasi dari sirip salmon yang telah diberi perlakuan pemanasan hingga suhu 80°C mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. typhimurium* dengan nilai diameter zona hambat sebesar 0,20 – 2 mm dan 0,30 – 2,80 mm.

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

Dalam aplikasinya, bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* FNCC 0020 ini mampu bekerja pada suhu ruang hingga suhu 121°C. Berdasarkan profil ini, bakteriosin ini cocok untuk digunakan sebagai pengawet makanan alami baik untuk yang tidak membutuhkan proses pemanasan seperti daging segar maupun

produk makanan yang membutuhkan pemanasan pada suhu tinggi seperti sosis, kornet dan makanan dalam kaleng.

4.4.2 Stabilitas Bakteriosin terhadap Suhu Penyimpanan

Bakteriosin asal *L. plantarum* yang disimpan selama 7 hari pada suhu yang berbeda, dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *E. coli* dan *S.aureus*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar *blank disc*. Nilai aktivitas zona hambat bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 terhadap bakteri indikator *E. coli* dan *S. aureus* dapat dilihat pada tabel 4.6.

Tabel 4.4. Pengaruh Variasi Suhu Penyimpanan terhadap Diameter Zona Hambat (mm) Bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 pada Bakteri Indikator

Perlakuan	Bakteri Indikator	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Suhu ruang	3,40 ^a	3,28 ^a
8°C	3,83 ^a	3,92 ^b
4°C	4,94 ^b	4,93 ^c
-20°C	4,71 ^b	4,75 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil berbeda nyata.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa signifikansi $< 0,05$ yang artinya terdapat pengaruh perbedaan suhu penyimpanan terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan bakteriosin. Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa perlakuan suhu ruang memberikan hasil yang berbeda nyata dengan suhu 4°C dan -20°C terhadap bakteri *E. coli*. Perlakuan penyimpanan pada suhu ruang tidak berbeda nyata dengan perlakuan suhu 18°C. Sedangkan perlakuan suhu 4°C tidak berbeda nyata terhadap perlakuan suhu -20°C.

Perlakuan terhadap bakteri uji *S. aureus* menunjukkan bahwa suhu ruang berbeda nyata terhadap perlakuan suhu 4°C, 18°C dan -20°C. Perlakuan suhu 4°C tidak berbeda nyata dengan perlakuan -20°C. Dari hasil analisis ini menunjukkan bahwa suhu dingin merupakan teknik penyimpanan yang sesuai untuk bakteriosin. Suhu efektif untuk penyimpanan bakteriosin berdasarkan pada tabel diatas yaitu pada suhu 4°C.

Pengamatan secara deskriptif menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan bakteriosin berbeda setiap perlakuan. Nilai penghambatan terendah ditunjukkan oleh bakteriosin yang disimpan pada suhu ruang, yaitu sebesar 3,40 mm dan 3,28 mm. Hal ini diduga disebabkan karena masih aktifnya enzim protease yang terkandung dalam cairan bakteriosin. Abo-Amer (2007) menambahkan bahwa penyimpanan pada suhu 37°C menyebabkan bakteriosin kehilangan aktivitasnya, berkaitan dengan adanya pengaruh dari enzim protease yang dapat ditemukan dalam larutan bakteriosin. Sebagaimana dijelaskan Suhartono (1989) bahwa protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein dan Furhan (2014) melaporkan bahwa aktivitas protease dari beberapa bakteri masih terdeteksi hingga suhu 10°C. Sehingga penyimpanan bakteriosin pada suhu ruang maupun suhu 18°C bukan merupakan teknik yang tepat.

Aktivitas penghambatan terbesar terjadi pada penyimpanan suhu dingin, yaitu suhu 4°C dan -20°C. Berdasarkan analisis uji Duncan, dapat disimpulkan bahwa suhu optimum untuk penyimpanan bakteriosin dari *L. plantarum* FNCC 0020 adalah pada suhu 4°C. Hasil ini senada dengan hasil penelitian yang

dilakukan oleh Yasmin (2015) bahwa bakteriosin dari bakteri asam laktat menghasilkan aktivitas maksimum ketika disimpan pada suhu 4°C dan suhu -20°C serta kemampuannya sedikit menurun ketika disimpan pada suhu ruang. Kusmarwati (2014) melaporkan bahwa bakteriosin bakteri asam laktat hasil isolasi dari rusip ikan juga stabil pada penyimpanan suhu 4°C selama 14 hari, Mohammed (2013) juga menyebutkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan *L. bulgaricus* Y34 tetap stabil setelah penyimpanan pada suhu 4°C selama 60 hari, sedikit stabil pada suhu 10°C dan tidak stabil pada suhu 30°C, begitupula hasil penelitian Radha (2015) yang menyebutkan bahwa suhu optimum untuk penyimpanan bakteriosin *L. delbruecki* subsp *bulgaricus* adalah 4°C dan Adebayo (2014) bahwa bakteriosin dari *L. fermentum* dan *L. casei* menghasilkan zona hambat maksimum dengan penyimpanan pada suhu 4°C dan -20°C.

Dundar (2006) menjelaskan bahwa kemampuan bakteriosin mempertahankan aktivitasnya pada penyimpanan suhu 4°C adalah karena pada suhu tersebut enzim protease yang terkandung dalam bakteriosin menjadi inaktif. Thomas dan Delves Broughton (2005) menyebutkan bahwa tingkat kehilangan aktivitas bakteriosin dapat diminimalisir dengan penyimpanan pada suhu rendah (<10°C).

4.4.3 Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi pH

Faktor pH seringkali menjadi pertimbangan bagi bahan pengawet yang akan diaplikasikan pada bahan pangan khususnya bahan hasil peternakan dengan kondisi pH yang rendah, diantaranya yaitu susu, keju, daging sapi, ham bakso, kornet dan lain-lain (Jay, 2000). Karakterisasi bakteriosin pada variasi pH

ini dilakukan untuk mengetahui ketahanan bakteriosin pada kondisi pH rendah. Pengaturan pH dilakukan dengan menambahkan HCl 1N dan NaOH 1N. Pengaruh perlakuan pH terhadap daya hambat bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5. Pengaruh Variasi pH terhadap Diameter Zona Hambat Bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 pada Bakteri Indikator

Perlakuan	Bakteri Indikator	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
pH 4	4,55	5,24
pH 5	4,24	4,48
pH 6	4,11	4,33
pH 7	4,01	4,27

Tabel 4.5 menunjukkan bahwa perlakuan variasi pH tidak mempengaruhi aktivitas penghambatan bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* FNCC 0020. Hasil analisis ragam menunjukkan signifikansi $> 0,05$ yang berarti tidak terdapat pengaruh perlakuan variasi pH terhadap aktivitas dari bakteriosin, yang mengindikasikan bahwa bakteriosin asal *L. plantarum* ini dapat stabil pada rentang pH asam (pH 4) hingga pH netral (pH 7).

Secara deskriptif dapat diketahui bahwa bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 memiliki aktivitas hambat terbesar pada pH 4 dengan nilai zona hambat sebesar 4,55 mm terhadap bakteri *E.coli* dan sebesar 5,24 terhadap bakteri *S.aureus*. Semakin bertambahnya nilai pH, zona hambat yang terbentuk semakin kecil, dimana pada pH netral (pH 7), bakteriosin *L. plantarum* FNCC 0020 menghasilkan zona hambat sebesar 4,01 mm terhadap bakteri *E.coli* dan 4,27 mm terhadap bakteri *S.aureus*. Hal serupa disampaikan pula oleh Najim (2012) bahwa bakteriosin *L. acidophilus* stabil pada rentang pH 4 – pH 7. Noordiana (2013)

menyebutkan bahwa bakteriosin asal bakteri asam laktat hasil isolasi dari sirip salmon mampu stabil pada pH 3-6 dengan nilai diameter zona hambat sebesar 1,80 – 3 mm terhadap bakteri *E. coli* dan 1,70 – 4 mm terhadap bakteri *S. typhimurium*. Mohamed (2013) melaporkan pula bahwa bakteriosin *L. lactis* memiliki spektrum yang luas pada pH 2 hingga pH 6 dan sedikit tidak stabil pada pH 8. Hata (2010) menyatakan bahwa plantaricin ASM 1 stabil pada pH 5,5 hingga pH 8,5. Ogunbawo (2003) juga melaporkan bahwa bakteriosin asal *L. brevis* OG1 dan *L. plantarum* F1 stabil pada rentang pH 2 hingga 6.

De Vuyst dan Vandamme (1994) menyebutkan bahwa respon sensitivitas bakteriosin sangat berbeda-beda terhadap inaktivasi oleh perubahan pH dan suhu. Banyak bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat hanya stabil pada pH asam dan netral dan tidak aktif pada pH diatas 8 (seperti nisin, lactosptrepcin, pediocin AcH, dan lain lain). Hal ini berhubungan dengan daya larut (solubilitas) bakteriosin asal bakteri asam laktat; titik isoelektrik bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat adalah sekitar 8,0-9,0 dan kelarutan bakteriosin semakin menurun seiring dengan meningkatnya nilai pH.

Aktivitas antibakteri umumnya semakin meningkat pada pH yang asam. Hal ini disebabkan karena pH asam dapat meningkatkan interaksi bakteriosin dengan reseptor membran. Molekul akan lebih banyak menempel pada dinding sel, sehingga molekul yang sifatnya bakterisidal akan semakin kuat (Parada, 2007).

Stabilitas bakteriosin pada kisaran pH yang luas penting kaitannya dalam penerapannya pada berbagai jenis pangan, baik pangan berasam tinggi, netral

maupun berasam rendah. Bakteriosin asal *L. plantarum* FNCC 0020 ini aktif dan stabil pada pH 4 hingga pH 7 sehingga cocok digunakan untuk pangan ber-pH asam hingga netral. Gautam (2014) menambahkan bahwa stabilitas bakteriosin pada pH netral cocok untuk diaplikasikan pada produk makanan dengan pH netral dan dapat digunakan sebagai alternatif menggantikan nisin yang hanya aktif pada pH 5.0 dan 5.5.

4.4 Kajian Keislaman Mengenai Bakteriosin dan Bakteri

Pemurnian protein antimikroba dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 ini bertujuan untuk mendapatkan protein murni dari bakteri asam laktat. *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 sendiri merupakan bakteri asam laktat hasil isolasi dari fermentasi kubis. Protein antimikroba murni yang diperoleh kemudian dikarakterisasi untuk mengetahui kestabilannya pada beberapa kondisi. Protein ini nantinya diharapkan dapat berguna sebagai bahan preservasi makanan, menggantikan bahan pengawet buatan. Allah SWT berfirman dalam Al Quran Surat Al Hijr (15) ayat 20:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَةً وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

Artinya: “dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rizki kepadanya”.

Asy-Syuyuti dan Jalaluddin (1505) dalam *tafsir Jalalain* menjelaskan bahwa Allah SWT telah menjadikan keperluan-keperluan hidup bagi manusia

berupa buah-buahan dan biji-bijian dan Allah SWT menjadikan makhluk-makhluk misalnya berupa hamba-hamba sahaya, binatang-binatang dan berbagai macam jenis ternak yang mana hanya Allah SWT-lah yang memberi rizki kepada mereka. Rizki yang diberikan Allah SWT kepada makhluknya ini dapat bermacam-macam bentuknya. Salah satunya yaitu berupa protein antimikroba pada bakteri.

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

Allah berfirman dalam Surat Al A'raf (7) ayat 56:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ

الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

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

Asy-Syuyuti dan Jalaluddin (1505) dalam *tafsir Jalalain* menjelaskan bahwa *lafadz wa laa tufsiduu fil ardi* bermakna “dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi dengan melakukan kemusyrikan dan perbuatan-perbuatan maksiat. Dalam *Tafsir Kementerian Agama* (2010) dijelaskan secara lebih luas bahwa larangan berbuat kerusakan ini mencakup semua bidang, seperti merusak pergaulan, jasmani dan rohani orang lain, kehidupan dan sumber-sumber penghidupan (pertanian, perdagangan dan lain-lain), merusak lingkungan dan lain sebagainya. Bumi ini diciptakan Allah SWT dengan segala kelengkapannya, seperti gunung, lembah, sungai, lautan, daratan, hutan dan lain sebagainya yang semuanya ditujukan untuk keperluan manusia agar dapat diolah dan dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya untuk kesejahteraan mereka.

Tafsir Al Misbah (Shihab, 2010) menjelaskan bahwa pengrusakan merupakan salah satu bentuk pelampauan batas. Karena itu ayat ini melanjutkan tuntunan ayat sebelumnya dengan menyatakan: dan janganlah kamu membuat kerusakan di bumi sesudah perbaikannya yang dilakukan oleh Allah SWT dan atau siapapun dan berdoalah serta beribadahlah kepadaNya.

Selanjutnya *lafadz al muhsinin* bermakna orang yang berbuat baik, yakni orang yang berbuat *ihsan* terhadap ibadahnya dan *ihsan* terhadap orang lain. Dalam konteks biologi, *lafadz al muhsinin* dapat diartikan pula sebagai orang-orang yang melakukan perbaikan, termasuk pula di dalamnya yaitu seorang peneliti. Bentuk pengaplikasian *ihsan* terhadap orang lain ini dapat dilakukan dengan cara menjaga dan melestarikan lingkungan agar tetap seimbang. Salah satu contohnya yaitu dengan memanfaatkan protein antimikroba yang dihasilkan oleh

bakteri sebagai biopreservatif pangan yang aman sebagai pengganti penggunaan bahan pengawet sintetis.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dipaparkan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 stabil pada suhu ruang hingga suhu 121°C dengan nilai penghambatan terhadap bakteri patogen sebesar 3,41 – 4,19 mm.
2. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 optimum disimpan pada suhu 4°C dan -20 °C dengan nilai penghambatan terhadap bakteri patogen sebesar 4,71 – 4,94 mm.
3. Bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020 stabil pada pH 4 hingga pH 7 dengan nilai penghambatan terhadap bakteri patogen sebesar 4,01 – 5,24 mm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian mengenai faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas bakteriosin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abo-Amer, A. 2007. Characterization of a Bacteriocin-like Inhibitory Substance Produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Egyptian home-made Yoghurt. *Sci. Asia*. 33: 313-319.
- Al Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir Al Quran Al Aisar Jilid 3*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Anas, Mami, Henni Jamal Eddine dan Kihal Mebrouk. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy And Food Sciences*. 3(2): 39-49.
- Angelis, De K. M. 2007. *Phosphate Buffer*. from CSHprotocols.org.
- Anguirre, M and M. Colins. 1993. Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infection. *Journal of Applied Bacteriology* 75: 95-107.
- Arief, I. I. 2011. *Karakterisasi bakteri asam laktat indigenus asal daging sapi sebagai probiotik dan identifikasinya dengan analisis urutan basa gen 16S rRNA*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- As Suyuthi, Jalaluddin dan Jalaluddin Muhammad Ibn Ahmad Al Mahalliy. 1505. *Tafsir Jalalain*. Kairo Mesir.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Grup.
- Axelsson, L. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. In: Roller, S. (Ed). *Natural Antimicrobial for The Minimal Processing of Food*. University of Wyoming, CRC Press, Wyoming.
- Bachrudin, Z., Astuti, dan Y.S. Dewi. 2000. Isolasi dan Seleksi Mikroba Penghasil Laktat dan Aplikasinya Pada Fermentasi Limbah Industri Tahu. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi. Mikrobiologi Enzim dan Bioteknologi*.
- Badan Standarisasi Nasional. 2000. *Standar Nasional Indonesia 01-6366-2000. Batas maksimum Cemaran mikroba pada Daging (cfu/gr)*. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Bahreisy, H. 1988. *Terjemah Singkat Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Kuala Lumpur: Victory Agencie
- Barefoot, S. F. & Neetless, C. G. 1993. Antibiotics Revisited: Bacteriocins Produced by Dairy Starter Culture. *J. Dairy Sci*. 76: 2366-2379.

- Bariyah, Khairul. 2012. Aktivitas Antimikrob Bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* terhadap Berbagai Bakteri Patogen selama Penyimpanan Suhu Dingin. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Beavers, G. H. 2005. Microbiology. <http://www.micr.oastate.edu/ugrad/student-micro-image.html>.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., dan Ray B. 1991. Influence of Growth Condition on The Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* with Broad Inhibitory Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4): 1265-1267.
- Boe. 1996. Evaluation of Optimum Production for Bacteriocin From *Lactobacillus* sp JB 42 Isolation from Kimchi. *J. Microbiol Biotech.* 6: 63-67.
- Buckle, K. A., RA. Edwards, dkk. 2007. *Ilmu Pangan*. Terjemahan H. Purnomo dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Campbell, Reece and Mitchell L. 1998. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Chanel, Richard. 1998. *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Chaplin MF, Bucke C. 1990. *Enzyme Technology*. New York: Cambridge Univ.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, & M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International J. Food Microb.* 71: -20.
- Cotelo, Martin Fraga, Karen P. Schein, Sheila S. Giacaman, Pablo M. Z. Abirad. 2013. Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Uruguayan Artisan Cheese. *Food Sci. Technol.* 33(4):801-804.
- Daeschel, M., Stevanovic, S. 1980. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* Belongs to A New Family of Two Peptide Lantibiotics. *Microbiology.* 147:643-651.
- Day, R. A. Jr. & A. L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif* . Jakarta: Erlangga.
- Dennison, C. 2002. *A Guide to Protein Isolation*. New York: Kluwer Academic Publisher.
- Doonan, S.2004. *Protein Purification Protocols. 2nd ed. Bulk Purification by Fractional Precipitation*. Human Press, Totowa, New Jersey.

- Drude, Djamel, Gunnar Fimland, Yandd Hechard, Lynn M. McMullen, and Herve Prevost. 2006. The Continuing Story of Class Iia Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70 (2).
- Dundar, Halil. 2006. Characterization and Purification of A Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris*. *Thesis*. Middle East Technical University.
- Elfrida, Dewi Sihombing. 2014. Aktivitas Antimikrob Plantarisin asal *Lactobacillus plantarum* IIA-IA5 dan Aplikasinya sebagai Pengawet Alami pada Daging Sapi. *Tesis*. Bogor: IPB.
- Elmatris, Faradila dan Yustini Alioes. 2014. Identifikasi Formalin pada Bakso yang Dijual pada Beberapa Tempat di Kota Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3 (2).
- Enan, G. A. A. El Essawy, M. Uytendaelle, & J. Debevere. 1996. Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 Isolated from Dry Sausage: Characterization, Production and Bactericidal Action of Plantaricin UG1. *International J. Food Microb.* 30: 189-215.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia.
- Frazier, WC. dan D. Westhoff. 1978. *Food Microbiology*. New Delhi: Tata McGraw Hill Company Limited.
- Furhan, Junaid dan Sarika Sharma. 2014. Isolation, Screening and Characterization of Cold Active Alkaline Protease from Wular Lake of Kashmir Region. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 4(1): 576-581.
- Galvez, A., H. Abriouel. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51-70.
- Gandjar, I. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: IKAPI
- Gautam N., Sharma N. 2014. Purification and Characterization of Bacteriocin Produces by *Lactobacillus brevis* UN isolated from Dhulliachar: A Traditional Food Product of North East India. *Ind J Microbiol.* 54: 185-189.
- Gonzales, B.,P. Arca, B. Mayo and J. E Suarez. 1994. Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a bacteriocin produced by A *Lactobacillus plantarum* strain of Dairy Origin. *J. Appl Environment Microbial*. Departamento de Biologia Funcional (Area de Microbiologia), Universidad de Oviedo, Oviedo.

- Griffin, D. H. 1991. *Fungal Physiology*. New York: A Willey Interscience Publication. 131-168.
- Hafsan. 2014. Bakteriosin Asal Bakteri Asam Laktat sebagai Biopreservatif Pangan. *Jurnal Tekno Sains*. 8 (2).
- Harianie, Liliek. 2013. Produksi Bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum* DJ3 dan Aplikasinya sebagai Pengawet Daging. *El Hayah*. 4 (1).
- Hata, T. R. Tanaka & S. Ohmomo. 2010. Isolation and Characterization of Plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int. J. Food Microbiol.* 137: 94-99.
- Helander, I. M., A. von Wright and T. M. Mattilla-Sandholm. 1997. Potential of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobial Againsts Gram negative Bacteria. *Trends in Food Sci and Technol*. Vol:8.
- Holo, H. Z. Jeknic, M. Daeschel, S. stevanovic and I. F. Nes. 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a New Family of Two-Peptide Lantibiotics. *Microbiol.* 147: 643-651.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. T. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Holzappel, W. H. 1988. *The Gram positive Bacteria Associated with Meat and Meat Production*. London: Blackie Academic and Professional.
- Hugas, M., and J. M. Monfort. 1998. Bacterial Starter Cultures for Meat Fermentation. *Food Chemist.* 4(59): 547-554.
- Istiqomah, L. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Fitase dari Saluran Pencernaan Unggas serta Karakterisasi Fitasenya. *Tesis*. Yogyakarta: UGM.
- Ivanova, I. P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova & X. Dousset. 2000. Detection, Purification and Partial Characterization of a Novel bacteriocins substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. Lactis B14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalyst*. 41(6): 47-53.
- Januarsyah, T. 2007. *Kajian Aktivitas Hambat Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Galur SCG 1223*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor.
- 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.

Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Van Nostrad Reinhold Company. New York.

Jenie, Sl. L dan Rini S. E. 1995. Aktivitas antimikroba dari beberapa spesies *Lactobacillus* terhadap mikroba patogen dan perusak makanan. *Bulletin teknologi dan Industri Pangan*. 7(2): 46-51.

Joshi, V. K., S. Sharma & N. S. Rana. 2006. Production, Purification, Stability and Efficacy of Bacteriocins from Isolates of Natural Lactic Acid Fermentation of Vegetables. *Food Technol. Biotechnol.* 44(3): 435-439.

Khalid, F., R. Siddiqi & N. Mojgani. 1999. Detection and characterization of a beat stable Bacteriocin. *Med. J. Islam. Acad. Sci.* 12 (3): 67-71.

Khoiriyah, Hanimatul dan Puji Ardiningsih. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* sp. RED4. JKK. Volume 3 (4): 52-56.

Kementerian Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Quran dan Tafsirnya Edisi yang Disempurnakan*. Jakarta: Departemen Agama RI.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-85.

Kout, Amel, Fatiha Dalache, Halima Zadi-Karam dan Nour-eddine Karam. 2016. Characterization and Purification of Bacteriocin Produced by Enterococcus sp. GHB26 from Algerian Paste of Dates "Ghars". *Academic Journal African Journal of Microbiology Reasearch*. 10 (25). 930-937.

Kristanti N.D. 2001. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraselular dari Kapang R. *Oryzae* TR 32 (*tesis*). Bogor: Program Pascasarjana Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor.

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.

Kusmiati, & A. Malik. 2002. Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbacl pada berbagai media. *Jurnal Makara Seri Kesehatan*. Sistem Informasi Jurnal Ilmiah UI.

Kuswanto, K. R., dan Slamet Sudarmadji. 1988. *Proses-proses Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.

- Lay, W.B. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium Edisi I*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lund, B. M. 2000. *Freezing*. Di dalam: Lund, B. M., T. C. Baird-Parker, G. W. Gould. (Eds), *The Microbiological Safety and Quality of Food Volume I*. 122-145. Aspen Publisher. Maryland.
- Madigan, M. T., Martiko J. M., Parker J. 2003. *Book Biology of Microorganism 10th ed.* New Jersey: Prentice-Hall.
- Magino dan Rahayu, E.S. 1997. Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi. Materi Workshop. *Seminar Makalah Tugas Akhir*. PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Maraghi, Ahmad. 1986. *Terjemah Tafsir Al Maraghi 4*. Toha Putra: Semarang.
- Marshall, S. H. 2003. Antimicrobial Peptides: As Natural Alternative to Chemical Antibiotics and A Potential for Applied Biotechnology. *Electron. J. Biotech.* 3(6).
- Mataragas, M., E.H. Drosinos and J. Metaxopoulos. 2003. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Againsts *Listeria monocytogenes* in Sliced Cooked Cured Pork Shoulder Stored under Vacuum or Modified Atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiology*. 20: 259-265.
- Matsuaki H, Endo N, Sonomoto K, and Ishikazi A. 1996. Lantibiotics Nisin Z Fermentaire Product by *Lactococcus lactis* 10-1: Relationship between Product of the Lantibiotic and Lactate All Growth. *Appl. Microbial, Biotechnol.* 45: 36-40.
- Mattjik, A. A. & M. Sumertajaya. 2002. *Perancangan Percobaan dengan aplikasi SAS dan Minitab. Jilid I Edisi Kedua*. Bogor: IPB Press
- Merzoug, M, Dalache F., Zadi-Karam, Karam N. E. 2015. Isolation and Preliminary Characterization of Bacteriocin Produced by *Enterococcus Faecium* GHB21 Isolated from Algerian Paste Dates "Ghars". *Ann. Microbiol.* 66: 795-805.
- Mohammed, S. S. D., Balogu, T. V., Yunusa, A. And Aliyu H. 2013. Antimicrobial Efficiency of Purified and Characterized Bacteriocin Produced by *Lactobacillus bulgaricus* Y34 and *Lactococcus lactis* N22 Isolated from Fermented Milk Products. *International Journal of Advanced Research*. 1. 63-70.

- Mozzi, F. , Raya, R. R., dan Vignolo, G. M. 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : Novel Applications*. Singapore: Wiley-Blackwell, 89-97.
- Mustafa, Ria Mariana. 2006. *Studi Efektivitas Bahan Pengawet alami dalam Pengawetan Tahu*. Skripsi. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Najim, Hadi, Zuhair Ahmad Mohammed, Zina Saab Khudir. 2012. The Antibacterial Activity of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Acidophilus* Isolates Against Sensitive Reference Strain *Lactobacillus Acidophilus* R0052 and its Stability to Different pH, Heating and Storage Temperatures. *Proceeding of The Eleventh Veterinary Scientific Conference*. 274-279.
- Neetles, C. G., and Barefoot, S. F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristic of Bacteriocins of Food-associated Lactic Acid Bacteria. *J. food Prot.* 56: 338-356.
- Noordiana, N., Fatimah A.B dan Mun A.S. 2013. Antibacterial Agents Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp. *International Food Research Journal*. 20 (1): 117-124.
- Nugrahani, Amidya, Hardoko, dan anik Martinah Hariati. 2016. Characterization of Bacteriocin *Lactobacillus casei* on Histamine Forming Bacteria. *J. Life Sci. Biomed.* 6 (1): 15-21.
- Nurani, D., Sukotjo, S., Nurnalasar, I. 2013. Optimasi Produksi Tepung Talas (*Colocasia esculenta*, L. Schott) Termodifikasi secara Fermentasi. *Jurnal IPTEK*. 8 (1): 65-71.
- Ogunbawo, S. T., A. I. Sarni & A. A. Onilude. 2003. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afric. Journal Biotechnol.* Vol:2. No. 8.: 210-227.
- Ooi, May Fong, Nurzafirah Mazlan, Hooi Ling Foo, Teck Chwen Loh, Rosfarizan Mohamad, Raha Abdul Rahim and Arbakariya Ariff. 2015. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Bacteriocin-Inhibitory Activity of Postbiotic Metabolites Produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malaysian Journal of Microbiology*. 11(12). 176-184.
- Pan, X., Chen F., Wu T., Tang H., dan Zhao Z. 2009. The Acid , Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J. Food Control*. 20 : 598-602.
- Panjaitan. 2009. Pemeriksaan dan Penetapan Kadar Boraks dalam Bakso di Kotamadya Medan.

- Parada, J. L., C. R. Caron, A. B. P. Medeiros, C. Ricardo. 2007. Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and Use as Biopreservatives. *Brazilian J. Biol. Technol.* 50:521-542.
- Pelczar, M. J. and R. D. Rheid. 1986. *Microbiology*. McGraw-Hill Book Co, New York.
- Pelczar, M. J. and E.C. S. Chan. 2007. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Terjemahan R. S. Hadioetomo, T. Imas, S. D. Tjitrosoemo dan S. L. Angka. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pierce. 2005. *Protein Stability and Storage*. www.piercenet.com
- Poedjiadi, A., Suprayanti, T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology: Guide to Protein Purification*. New York: Academic Press.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Purseglove, J. W., Brown E. G., Green C. L., Robbins S. R. J. 1981. *Turmeric. Dalam Spices*. Vol 2. New York: Longman Inc. 644-705.
- Rachmawati, Intan, Suranto, Ratna Setyaningsih. 2005. Uji antibakteri Bakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen. *Bioteknologi*. 2(2):43-48.
- Radha, K. R., Padmavati Tallapragada. 2015. Purification, Characterization and Application of Bacteriocin for Improvin the Shelf-life of Sprouts: An Approach to Biopreservation. *International Journal of ChemTech Research*. 8(8):265-277.
- Rahayu, E. 2001. *Potensi Bakteri Asam Laktat di Bidang Industri Pangan*, Prosiding Seminar Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia.
- Rawal, Khushboo, Nirav Bavshar, Gopal Raol, B. V. Raol dan J. D. Patel. 2013. Bacteriocin: Production and Optimization by *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 3(6): 64-76.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food microbiology*. 3rd Edition. CRC Press Boca Raton, New York, Whasington D.C, London.

- Reiny, S.S. 2012. Potensi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai Biopreservatif pada Rebusan Daging Ikan Tongkol. *Jurnal IJAS*. 2 (2): 604-613.
- Rosyada, N .2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Program Studi Biologi Fakultas MIPA, UNS.
- Rumjuankiat, Kittapon, Komkhae Pilasombut, Somchai Wangwibulkit & Adisorn Swetwiwathana. 2010. Screening and Partial Characterization of Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria in Fish Gastrointestinal Tract. *KKU Res J*. 15 (9).
- Saenz, Y, Rojo-Bezares dkk. 2009. Genetic Diversity of pln Locus Among Oenological *Lactobacillus plantarum* Strains. *Int J Food Microbial*. 134: 176-183.
- Sankar, N. Ravi, V. Deepthi Priyanka, P. Srinivas Reddy. 2012. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. *International Journal of Microbiological Research*. 3(2):133-137.
- Saparinto, C. dan Hidayati, D. 2006. *Bahan Tambahan Pangan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sapatnekar, N. M., S. N. Patil dan B. A. Aglave. 2010. Extraction of Bacteriocin and Study of Its Antagonistic Assay. *International J. Biotechnol and Biochem*. (6) : 865-870.
- Saraiva, Margarette Alice Fontes, Ingolf Figved Nes, Maria Cristina Baracat-Pereira, Marisa Vieira de Queiroz, Hilario Cuquetto Mantovani dan Celia Alencar de Moraes. 2014. Purification and Characterization of A Bacteriocin Prduced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6.9. *Journal of Microbiology and Antimicrobial*. 6 (5): 79-87.
- Savadogo, A., A. T. O. Cheik, H. N. B. Imael and S. A. Traore. 2004. Antimicrobial activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Burkina Faso Fermented Milk. *J. Pakistan Journal of Nutrition*. 3(3): 174-179.
- Schnell, N., Entian K., Schneider U., Gots F., Zahner H., Kellner R., dan Jung G. 1998. Prepeptida Sequence of Epidermin, A Ribosomally Synthezide Antibiotic with Four Sulphide Ring. *Nature London*. 333 : 276-278.
- Scopes RK. 1987. *Protein Purification*. New York. Springer-Verlag.

- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Smid, EJ dan LGM. Gorris .2007. *Natural Antimicrobial for food Preservation*. In: Rahman, M. S (Editor). *Handbook of Food Preservation*. New York : CRC Press.
- Sorensen, H., S. Sorensen, C. Bjegegaard and S. Michelson. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Sri, A. F. 2009. *Bakteri Asam Laktat*. Pustaka Universitas Padjajaran.
- Stiles ME, Hastings JW. 1991. Bacteriocins Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation. *Trends Food Sci Technol*. 2: 247-251.
- Suarsana, I. N. 2003. Sifat Fisikokimia Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *J. Veteriner*. Vol 4(4).
- Suhartono, M. T., Suwanto A., Widjaja H.1992. Diktat Struktur dan Biokimiawi Protein. Bogor: PAU IPB.
- Suklan, H.2002. Apa dan Mengapa boraks Dalam Makanan. *Penyehatan Air dan Sanitasi (PAS)*. 14(7).
- Supriyono, A dan Ika S. 2013. Kandungan Formalin dalam ayam Potong di Pasar Tradisional Semarang Tahun 2012. *Jurnal Visikes*. 12 (1).
- Suryani, Y., Astuti., Bernandeta, O., Siti, U. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*.
- Sutrisna, R. 2013. Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik (*Anas domestica*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella pullorum*. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi V*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. 396-407.
- Syahniar, TM. 2009. Produksi dan Karakterisasi Bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* 1A5 serta Aktivitas Antimikrobanya terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Peternakan, IPB.
- Tagg, J. R., A. S. dajani, and L. W. Wannaker. 1976. Bacteriocin of Gram Positive Bacteria. *Bacteriol. Rev*. 11: 722-756.

- Thomas, L. V dan J. Delves-Broughton. 2005. *Nisin*. Di Dalam *Antimicrobial in Food*, 3rd Ed. (Davidson, P. M., J. N. Sofos dan A. L. Branen Eds). Taylor and Francis Group.
- Tiwari, SK dan Srivastava S. 2008. Purification and Characterization of Plantaricin LR14: A novel bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LR14. *Appl. Microbial Biotechnol.* 7(2): 129-135.
- Todar, Kenneth. 2009. Online Textbook of Bacteriology. http://www.textbookofbacteriology.net/kt_toc.html.
- Todorov, S. D. & L. M. T. Dicks. 2005. Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST 194BZ, a strain isolated from Boza. *J. food. Technol Biotechnol.* 43 (2): 165-173.
- Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case. 2006. *Microbiology an Introduction 9th Edition*. San Fransisco: Pearson Education Inc.
- Trinanda, Muh Ade. 2015. Studi Aktivitas Bakteri Asam Laktat (*L. plantarum* dan *L. fermentum*) terhadap Kadar Protein Melalui Penambahan Tepung Kedelai pada Bubur Instan Terfermentasi. *Skripsi*. UNY.
- Usmiati, S. & R. R. A. Maheswari. 2009. Pengaruh penggunaan bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. Galur SCG 1223 terhadap kualitas mikrobiologi Daging Sapi Segar. *JITV*. 14 (2): 150-166.
- Villani, F., M. Aponte, dkk. 2001. Detection and Characterization of a Bacteriocin, Garviecin L-5, Produced by *Lactococcus Garvieae* from Raw Cow's Milk. *J. Appl. Microbiol.* 90: 430-439.
- Vuyst, L. D. & J. Vandamme. 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Application*. Blackie Academic and Professional, London.
- Walker, J. 2000. *Principle and Techniques of Practical Biochemistry. Protein Structure, Purification and Characterization*. 5th Edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- Waluyo, L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. Malang: UMM Press.
- Wirahadikusumah, M. 2008. *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Cetakan Ketujuh. Bandung: ITB Bandung.
- Volk, WA dan Weeler, MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markam. Erlangga: Jakarta.

- Vuyst, L. D. & F. Leroy. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification and Food Application. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194-199.
- Zahid, Muhammad, Aqeela Y., M. Ashraf, M. Arshad, Ghulam Muhammad, dan Bahar E. Mustafa. 2015. Antimicrobial Activity of Bacteriocin Isolated from Lactic Acid Bacteria Against Resistant Pathogenic Strains. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(3): 326-331.
- Yuliarti, N. 2007. *Awas Bahaya di Balik lezatnya Makanan*. Yogyakarta: Andi.
- Yulinery, Titin dan Novik Nurhidayat. 2003. Aktivitas antimikroba dan Analisis Gen Plantaricin F dari Isolat *Lactobacillus* asal Buah-buahan Tropis. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 11 (2): 147-155.
- Yuningsih, S. 2006. Isolasi dan Pencirian Protease dari Bakteri Isolat Nato. *Skripsi*. Bogor: FMIPA IPB.
- Zhou, Fang, Hongfeng Zhao, Fengling Bai, Piotr Dziugan. 2014. Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Chinese Pickle. *Czech J. Food Sci.* No: 5. 430-43.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Reagen dan Media

L.1.1 Pembuatan Reagen Lowry (Trinanda, 2015)

Untuk pembuatan reagen Lowry, disiapkan:

1. Larutan A : 2 gr Na_2CO_3 + 0,4 gr NaOH dalam 100 ml aquades
2. Larutan B : 0,25 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 gr Na.K- Tartrat dalam 50 ml aquades
3. Larutan C : 50 ml larutan A + 1 ml larutan B
4. Larutan D : Kedalam 10 ml Folin ditambahkan 10 ml aquades

L.1.2 Pembuatan Buffer Fosfat pH 6,8 (Angelis, 2007)

a. Pembuatan Stok 1M

a) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Mr= 228,18)	b) KH_2PO_4 (Mr= 136,09)
Molaritas = $\frac{\text{Berat}}{\text{Mr} \times \text{Volume}}$	Molaritas = $\frac{\text{Berat}}{\text{Mr} \times \text{Volume}}$
$1 \text{ M} = \frac{\text{X gram}}{228,18 \times 0,1}$	$1 \text{ M} = \frac{\text{X gram}}{136,09 \times 0,1}$
$\text{X} = 22,818 \text{ gram dalam}$	$\text{X} = 13,609 \text{ gram dalam}$
100 ml aquades	100 ml aquades

Stok 1M (100 ml) pH= 6,8

1M K_2HPO_4 (49,7 ml)	+	1M KH_2PO_4 (50,3 ml)	= 100 ml Buffer Kalium Fosfat 1M pH 6-6,8
--	---	--	---

b. Pengenceran 1M menjadi 0,05 M

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

$$100 \text{ ml} \times 1\text{M} = V_2 \times 0,05\text{M}$$

$$V_2 = 100/0,05$$

$$= 2000 \text{ ml}$$

❖ 100 ml buffer kalium fosfat 1M dalam 1900 ml aquades

c. Pengenceran 1M menjadi 0,2 M

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

$$50 \text{ ml} \times 1\text{M} = V_2 \times 0,2\text{M}$$

$$V_2 = 50/0,2$$

$$= 250 \text{ ml}$$

❖ 50 ml buffer kalium fosfat 1M dalam 200 ml aquades

L.1.3 Pembuatan NaOH 1N

$$N = M \times \text{Valensi}_{\text{NaOH}}$$

$$1 = M \times 1 \rightarrow M = 1$$

$$M = \frac{W_{\text{NaOH}}}{\text{BM}} \times \frac{1000}{\text{vol(ml)}}$$

$$1 = \frac{W_{\text{NaOH}}}{40} \times \frac{1000}{1000}$$

$$W_{\text{NaOH}} = 40 \text{ gram dalam 1 liter.}$$

L.1.4 Pembuatan BaCl₂·2H₂O 0,1M (Mr = 244)

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{Berat}}{\text{Mr} \times \text{Volume}}$$

$$\text{Mr} \times \text{Volume}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{\text{X gram}}{\text{-----}}$$

$$244 \times 0,05$$

$$\text{X} = 1,22 \text{ gram BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ dalam } 50 \text{ ml aquades}$$

L.1.5 Pembuatan Media Produksi Bakteriosin

Ditimbang 27,5 gram MRSB, 15 gram *yeast extract* dan 5 gram NaCl. Semua bahan dimasukkan dalam beaker glass 1000 ml dan ditambahkan dengan aquades sebanyak 500 ml, dipanaskan hingga mendidih diatas hotplate sambil dihomogenkan dengan stirer. Selanjutnya media dipindahkan dalam erlenmeyer 800 ml dan ditutup dengan kapas dan plastik wrap. Media disterilisasi dalam autoklaf suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Lampiran 2. Preparasi Kantong Selofan (Sonia, 2015)

- a) Kantong selofan didihkan dalam 5% Na₂CO₃ (5 gram dalam 100 ml) selama 15 menit.
- b) Didihkan dengan 50 mM EDTA (1,4612 gr dalam 100 ml)
- c) Dicuci dengan aquades steril mendidih selama 15 menit.
- d) Rendam kantong selofan dalam air, jangan sampai kering.

Lampiran 3. Pembuatan Kurva Standar Protein

L.3.1 Pembuatan Larutan Standar Protein

Cara pembuatan larutan stok Bovine Serum Albumin (BSA) 1000 ppm adalah:

$$1000 \text{ ppm} = \frac{50.000 \mu\text{g}}{50 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan protein standar 1000 ppm dibutuhkan 50.000 μg Bovine Serum Albumine (BSA), dilarutkan dalam 50 ml aquades. Selanjutnya dibuat larutan BSA dengan variasi konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm sebanyak 100 ml sesuai dengan hasil perhitungan berikut:

e) Konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 20$$

$$V_1 = 2 \text{ ml larutan stok dalam } 98 \text{ ml aquades}$$

f) Konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 40$$

$$V_1 = 4 \text{ ml larutan stok dalam } 96 \text{ ml aquades}$$

g) Konsentrasi 60 $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 60$$

$$V_1 = 6 \text{ ml larutan stok dalam } 94 \text{ ml aquades}$$

h) Konsentrasi 80 $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 80$$

$$V_1 = 8 \text{ ml larutan stok dalam } 92 \text{ ml aquades}$$

i) Konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 100$$

$V_1 = 10$ ml larutan stok dalam 90 ml aquades

j) Konsentrasi 120 $\mu\text{g/ml}$

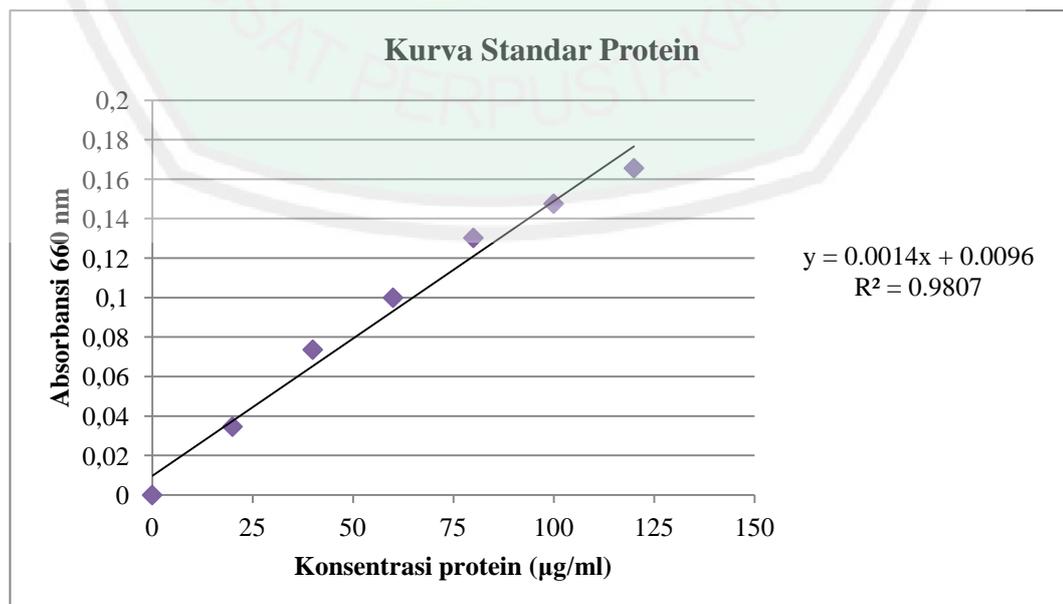
$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 100 \times 120$$

$V_1 = 12$ ml larutan stok dalam 88 ml aquades

L.3.2 Hasil Pengukuran Absorbansi BSA

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	I	II	III
0	0,00	0,00	0,00
20	0,034	0,036	0,034
40	0,075	0,073	0,073
60	0,100	0,99	0,101
80	0,127	0,130	0,134
100	0,147	0,148	0,148
120	0,168	0,166	0,163



L.3.3 Menentukan Konsentrasi Protein Bakteriosin

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

$$\text{Misal : } y = ax + b$$

$$y = 0,0014x + 0,0096$$

$$0,158 = 0,0014x + 0,0096$$

$$x = \frac{0,158 - 0,0096}{0,0014} \times fp$$

$$x = 106 \times 10$$

$$x = 1060 \mu\text{g/ml}$$

Tabel L. 3.3 Data Absorbansi dan Konsentrasi Protein Bakteriosin pada Tiap Tahap Pemurnian

Sampel	Volume (ml)	Absorbansi	Konsentrasi Protein($\mu\text{g/ml}$)
Supernatan sel bebas	495	0,158	1060
Presipitat bakteriosin	13	0,113	738,57
Bakteriosin murni	16	0,059	352,86

Lampiran 4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

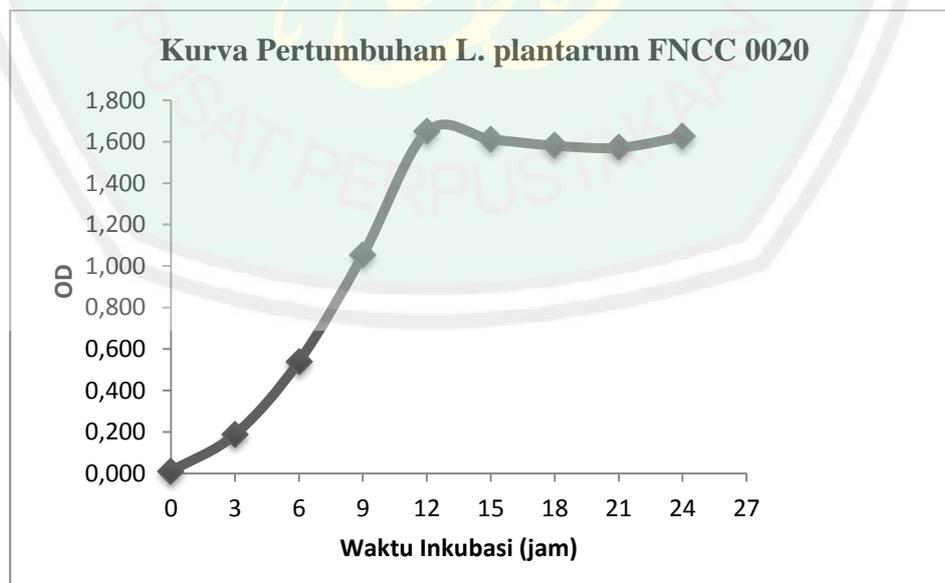
FNCC 0020

L.4.1 Hasil Pengukuran Absorbansi (OD) *Lactobacillus plantarum* FNCC

0020

Jam ke-	Nilai OD			Rata-rata
	I	II	III	
Blanko	0,000	0,000	0,000	0,000
0	0,010	0,011	0,013	0,011
3	0,198	0,183	0,183	0,188
6	0,536	0,541	0,543	0,540
9	1,053	1,051	1,061	1,055
12	1,646	1,649	1,651	1,648
15	1,608	1,617	1,612	1,612
18	1,581	1,585	1,579	1,581
21	1,564	1,586	1,563	1,571
24	1,624	1,627	1,622	1,624

L.4.2 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* FNCC 0020



Lampiran 5. Penentuan Penambahan Amonium Sulfat

Awal (%)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Kosentrasi Akhir dari Padatan Amonium Sulfat (gram) dalam 1 L																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	112	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	86	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	29	56	87	118	151	184	218	258	296	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	263	296	335	376	418
45						0	30	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	12	159	190	235	268	308	348
55								0	31	61	93	127	161	201	235	273	312
60									0	31	62	95	129	168	201	239	279
65										0	32	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	33	66	101	137	174
80													0	34	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Untuk kejenuhan 60% dalam 500 ml media, maka ditambahkan amonium sulfat

$$\begin{aligned} \text{sebanyak} &= \frac{361}{1000} \times 500 \\ &= 258 \text{ gram} \end{aligned}$$

Lampiran 6. Hasil Purifikasi

L.6.1 Tabel Kondisi pH Supernatan Bebas Sel dan Supernatan Netral

Sampel	pH
Supernatan bebas sel	4,09
Supernatan Netral	6,17

L.6.2 Tabel Hasil Uji Antagonistik Supernatan Netral Terhadap Bakteri

Indikator

Bakteri indikator	d zona hambat (mm)	Rasio*
<i>Escherichia coli</i>	6,32	Kuat
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,57	Kuat

Lampiran 7. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteriosin

L.plantarum terhadap Bakteri Indikator pada variasi pH, Suhu Pemanasan dan Suhu Penyimpanan

L.7.1 Tabel Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi pH

Perlakuan Ulangan	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
I	4,26	3,20	3,66	4,81	4,26	3,21	3,66	4,81
II	5,14	5,01	5,30	3,78	4,92	4,86	4,46	3,45
III	4,40	4,66	4,71	4,10	4,44	5,56	5,94	3,52
IV	4,40	5,33	3,23	3,63	5,64	2,6	3,73	4,12
V	5,32	3,98	4,25	4,55	3,70	4,89	4,51	4,29
VI	4,93	4,71	4,84	4,79	4,36	4,34	4,38	3,91
Rata-rata	5,24	4,48	4,33	4,27	4,55	4,24	4,11	4,01

L.7.2 Tabel Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi Suhu Pemanasan

Perlakuan Ulangan	<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Ruang	80 ⁰ C	100 ⁰ C	121 ⁰ C	Ruang	80 ⁰ C	100 ⁰ C	121 ⁰ C
I	3,75	3,33	3,56	3,21	3,92	3,87	3,87	3,33
II	3,63	3,17	3,32	3,19	3,44	4,96	4,10	3,53
III	3,44	3,52	3,13	3,10	3,20	3,95	4,43	4,02
IV	3,56	3,83	3,22	3,31	4,15	4,10	3,54	4,11
V	3,78	3,56	3,25	3,34	3,56	4,33	4,17	3,46
VI	4,11	3,41	3,87	3,91	3,74	3,94	3,67	3,38
Rata-rata	3,71	3,53	3,41	3,51	4,01	4,19	3,96	3,63

L.7.3 Tabel Stabilitas Bakteriosin terhadap Variasi Suhu Penyimpanan

Perlakuan Ulangan	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	Ruang	18 ⁰ C	4 ⁰ C	-20 ⁰ C	Ruang	18 ⁰ C	4 ⁰ C	-20 ⁰ C
I	3,37	3,57	4,98	4,81	4,11	3,95	5,63	4,51
II	3,48	4,11	5,23	5,17	3,67	3,26	4,77	5,00
III	3,13	3,77	4,59	4,40	2,90	3,28	4,62	5,01
IV	2,91	4,07	5,14	4,33	3,54	3,59	5,17	4,41
V	3,65	4,12	4,79	5,14	3,12	4,33	4,65	4,67
VI	3,17	3,89	4,88	4,69	3,10	4,58	4,80	4,69
Rata-rata	3,28	3,92	4,93	4,75	3,40	3,83	4,94	4,71

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



(H)



(I)



(J)



(K)



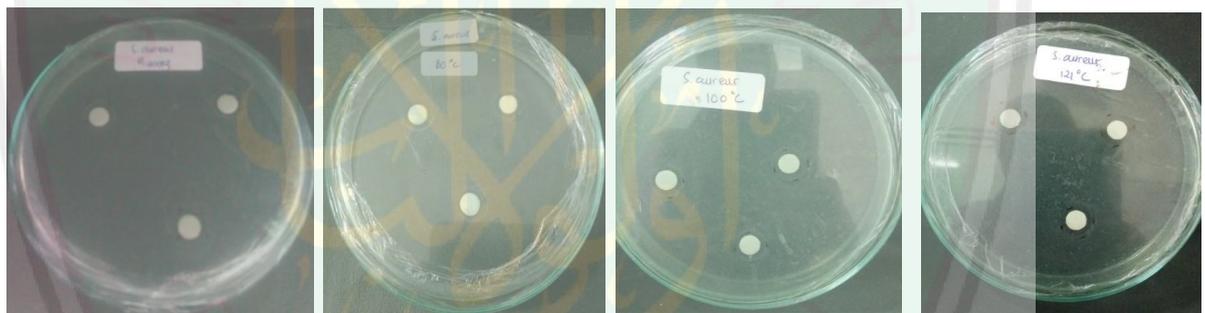
(L)

Keterangan : (A) Proses pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan spektrofotometer (B) proses produksi menggunakan *shaker waterbath* (C) sentrifugasi dingin untuk memisahkan pelet dan supernatan (D) pelet dan supernatan bebas sel (E) pengukuran pH supernatan bebas sel (F) penambahan amonium sulfat untuk mengendapkan protein (G) pengkondisian suhu dingin menggunakan ice gel (H) proses dialisis diatas hotplate (I) pengukuran protein metode Lowry (J) Bakteriosin hasil dialisis (K) proses perlakuan variasi suhu pemanasan pada bakteriosin (L) diameter zona hambat yang dihasilkan bakteriosin.

Lampiran 9. Aktivitas Bakteriosin terhadap Bakteri Indikator

L.9.1 *Staphylococcus aureus*

a. Variasi Suhu Pemanasan



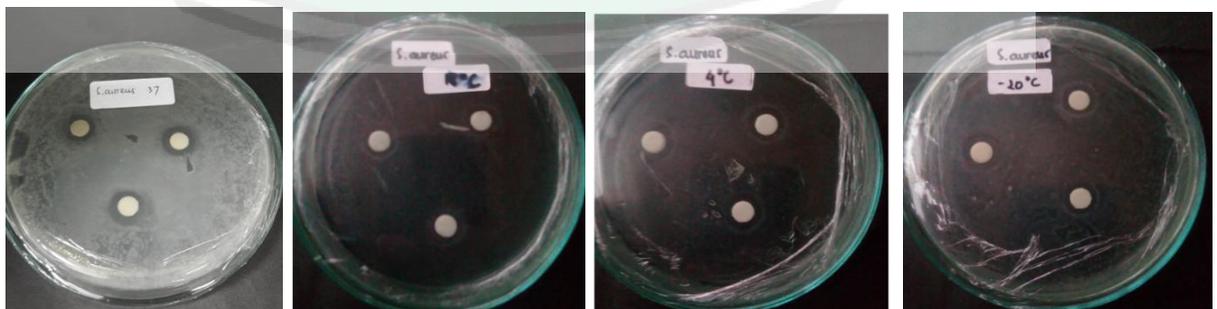
S.aureus (ruang)

S.aureus (80°C)

S.aureus (100°C)

S.aureus (121°C)

b. Variasi Suhu Penyimpanan



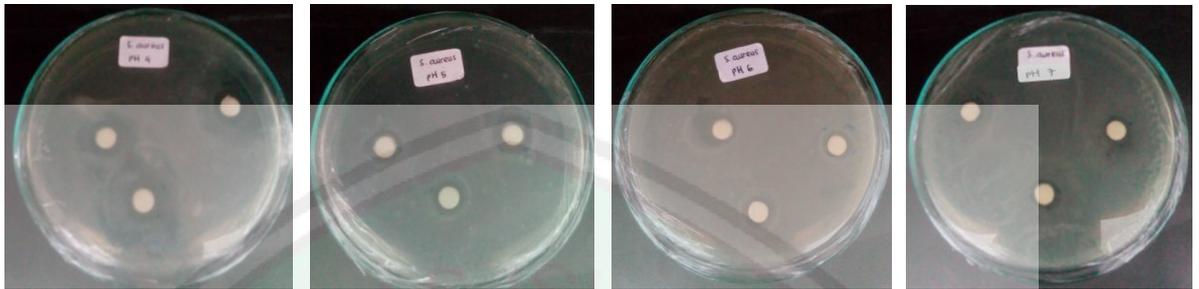
S.aureus (ruang)

S.aureus (18°C)

S.aureus (4°C)

S.aureus (-20°C)

c. Variasi pH



S.aureus (pH 4)

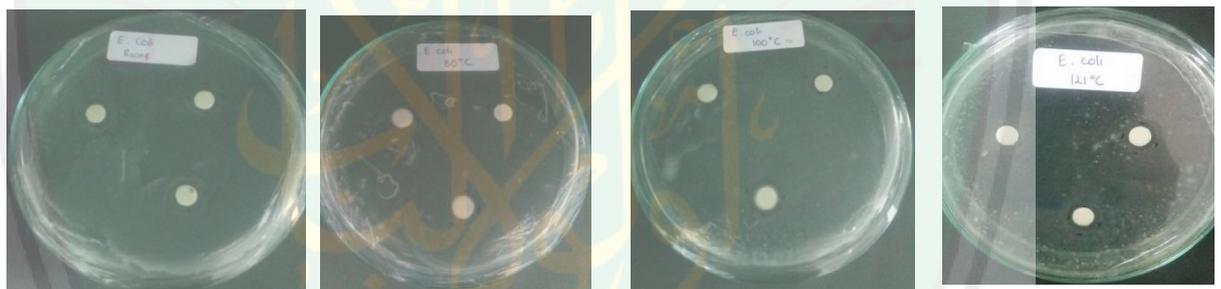
S.aureus (pH 5)

S.aureus (pH 6)

S.aureus (pH 7)

L.9.2 *Escherichia coli*

a. Variasi Suhu Pemanasan



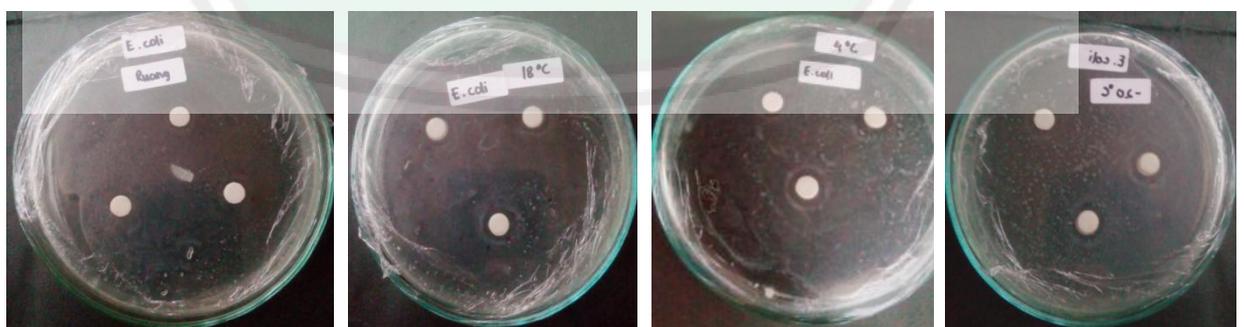
E. coli (ruang)

E. coli (80°C)

E. coli (100°C)

E. coli (121°C)

b. Variasi Suhu Penyimpanan



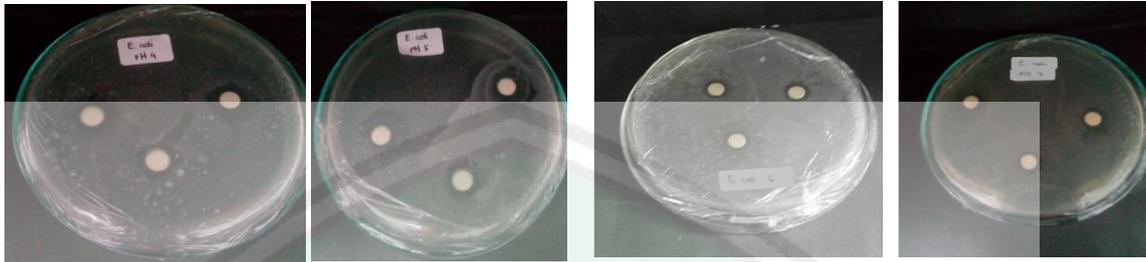
E. coli (ruang)

E. coli (18°C)

E. coli (4°C)

E. coli (-20°C)

c. Variasi pH



E. coli (pH 4)

E. coli (pH 5)

E. coli (pH 6)

E. coli (pH 7)

Lampiran 10. Perhitungan Statistik Hasil Penelitian Diameter Zona Hambat Bakteriosin dengan SPSS One Way Anova dan Uji Lanjut Duncan

L.10.1 Perlakuan Variasi Suhu Pemanasan Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*

L.10.1.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AureusPanas
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	9.9487
	Std. Deviation	.38694
Most Extreme Differences	Absolute	.092
	Positive	.092
	Negative	-.086
Kolmogorov-Smirnov Z		.453
Asymp. Sig. (2-tailed)		.986
a. Test distribution is Normal.		

L.10.1.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

AureusPanas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.062	3	20	.979

L.10.1.3 Uji One Way Anova

ANOVA

AureusPanas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.950	3	.317	2.541	.085
Within Groups	2.493	20	.125		
Total	3.444	23			

L.10.2 Perlakuan Variasi Suhu Pemanasan Bakteriosin terhadap *Escherichia coli*

L.10.2.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		EcoliPanas
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	9.4654
	Std. Deviation	.29555
Most Extreme Differences	Absolute	.123
	Positive	.123
	Negative	-.082
Kolmogorov-Smirnov Z		.601
Asymp. Sig. (2-tailed)		.863
a. Test distribution is Normal.		

L.10.2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

EcoliPanas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.133	3	20	.939

L.10.2.3 Uji One Way Anova

ANOVA

EcoliPanas	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.501	3	.167	2.216	.118
Within Groups	1.508	20	.075		
Total	2.009	23			

L.10.3 Perlakuan Variasi Suhu Penyimpanan Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*

L.10.3.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AureusDingin
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	10.2246
	Std. Deviation	.72483
Most Extreme Differences	Absolute	.116
	Positive	.083
	Negative	-.116
Kolmogorov-Smirnov Z		.567
Asymp. Sig. (2-tailed)		.905
a. Test distribution is Normal.		

L.10.3.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

AureusDingin

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.788	3	20	.515

L.10.3.3 Uji One Way Anova

ANOVA

AureusDingin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.574	3	3.525	46.707	.000
Within Groups	1.509	20	.075		
Total	12.084	23			

L.10.3.4 Uji Duncan

Aureus_panas

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	6	9.2850		
2	6		9.9217	
4	6			10.7567
3	6			10.9350
Sig.		1.000	1.000	.274

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

L.10.4 Perlakuan Variasi Suhu Penyimpanan Bakteriosin terhadap *Escherichia coli*

L.10.4.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ecolidingin
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	10.2233
	Std. Deviation	.75327
Most Extreme Differences	Absolute	.148
	Positive	.103
	Negative	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		.726
Asymp. Sig. (2-tailed)		.667
a. Test distribution is Normal.		

L.10.4.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Ecolidingin

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.907	3	20	.161

L.10.4.3 Uji One Way Anova

ANOVA

Ecolidingin	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.454	3	3.151	17.524	.000
Within Groups	3.597	20	.180		
Total	13.051	23			

L.10.4.4 Uji Duncan

EcoliDingin

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	6	9.5233	
2	6	9.8317	
4	6		10.7150
3	6		10.9400
Sig.		.298	.444

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

L.10.5 Perlakuan Variasi pH Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*

L.10.5.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		AureuspH
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	10.5788
	Std. Deviation	.80232
Most Extreme Differences	Absolute	.091
	Positive	.091
	Negative	-.082
Kolmogorov-Smirnov Z		.447
Asymp. Sig. (2-tailed)		.988
a. Test distribution is Normal.		

L.10.5.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

AureuspH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.665	3	20	.583

L.10.5.3 Uji One Way Anova

ANOVA

AureuspH					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.669	3	1.223	2.197	.120
Within Groups	11.136	20	.557		
Total	14.805	23			

L.10.6 Perlakuan Variasi pH Bakteriosin terhadap *Escherichia coli*

L.10.6.1 Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		EcolipH
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	10.2317
	Std. Deviation	.70703
Most Extreme Differences	Absolute	.099
	Positive	.097
	Negative	-.099
Kolmogorov-Smirnov Z		.487
Asymp. Sig. (2-tailed)		.972
a. Test distribution is Normal.		

L.10.6.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

EcolipH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.779	3	20	.068

L.10.6.3 Uji One Way Anova

ANOVA

EcolipH	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.983	3	.328	.623	.608
Within Groups	10.515	20	.526		
Total	11.498	23			



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

Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Nadya Suwayvia
NIM : 12620050
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
Judul Skripsi : Produksi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum*
FNCC0020 Sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada
Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan pH
Dosen Pembimbing : Ir. Hj. Liliek Harianie, A.R., M.P.

No	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1	15 Februari 2016	Konsultasi Judul	<i>Hn</i>
2	18 Februari 2016	Konsultasi Bab I dan III	<i>Hn</i>
3	19 Februari 2016	Revisi Bab I dan III	<i>Hn</i>
4	22 Februari 2016	Revisi Bab I	<i>Hn</i>
5	29 Februari 2016	Revisi Bab I dan Konsultasi Bab II	<i>Hn</i>
6	09 Maret 2016	Revisi Bab II dan III	<i>Hn</i>
7	21 Maret 2016	ACC Bab I, II dan III	<i>Hn</i>
8	03 Juni 2016	Konsultasi Bab IV	<i>Hn</i>
9	15 Juni 2016	Revisi Bab IV	<i>Hn</i>
10	22 Agustus 2016	Revisi dan Konsultasi Bab IV	<i>Hn</i>
11	27 September 2016	Revisi dan Konsultasi Bab IV dan V	<i>Hn</i>
12	06 Desember 2016	Konsultasi Bab I, II, III, IV dan V	<i>Hn</i>
13	09 Desember 2016	Revisi Bab I, II, III, IV dan V	<i>Hn</i>
14	16 Desember 2016	Konsultasi Naskah Keseluruhan	<i>Hn</i>
15	20 Desember 2016	ACC Naskah Keseluruhan	<i>Hn</i>

Malang, 22 Desember 2016
Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

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



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

Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

KARTU KONSULTASI AGAMA

Nama : Nadya Suwayvia
 NIM : 12620050
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi
 Judul Skripsi : Produksi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum*
 FNCC0020 Sebagai Antimikroba dan Stabilitasnya pada
 Variasi Suhu Pemanasan, Suhu Penyimpanan dan pH
 Dosen Pembimbing : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.

No	Tanggal	Perihal	Tanda Tangan
1	22 Februari 2016	Konsultasi Bab I	
2	29 Februari 2016	Revisi Bab I	
3	09 Maret 2016	Konsultasi Bab I dan II	
4	18 Maret 2016	Revisi Bab I dan II	
5	21 Maret 2016	ACC Bab I, II, III	
6	23 Agustus 2016	Konsultasi Bab IV	
7	27 September 2016	Konsultasi Bab IV	
8	21 Desember 2016	Konsultasi Naskah Keseluruhan	
9	22 Desember 2016	ACC Naskah Keseluruhan	

Malang, 22 Desember 2016
 Mengetahui,
 Ketua Jurusan Biologi

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