

## **Karakteristik Fisikokimia dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteriosin dari Isolat Bakteri Asam Laktat 15B Hasil Isolasi Kolon Sapi Bali**

*(PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF BACTERIOCIN FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATE 15B ORIGINATED FROM BALI CATTLE'COLON ISOLATION)*

**Ni Kadek Lyming Lestari<sup>1\*</sup>, I Dewa Made Sukrama<sup>2</sup>, I Wayan Suardana<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Praktisi Dokter hewan di Kabupaten Tabanan Bali. <sup>2</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana. <sup>3</sup>Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. \*Email: [lymingnheu@gmail.com](mailto:lymingnheu@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri Gram positif, berbentuk kokus atau batang dan katalase negatif serta mampu menghasilkan asam laktat. BAL juga merupakan suatu mikroorganisme yang memiliki sifat tidak toksik dan mampu menghasilkan senyawa antimikroba, berupa bakteriosin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter fisikokimia dan aktivitas antimikroba bakteriosin dari isolat 15B hasil isolasi dari kolon sapi bali. Penelitian dimulai dengan menanam ulang isolat 15B dan dilanjutkan dengan kultivasi isolat, isolasi, produksi dan presipitasi bakteriosin. Tahap selanjutnya dilakukan uji sifat fisika dan kimiawi dari bakteriosin, dilanjutkan dengan uji aktivitas. Hasil kultivasi isolat menunjukkan bahwa isolat 15B merupakan bakteri asam laktat yang ditandai dengan hasil pewarnaan sebagai Gram positif, uji katalase negatif dan tumbuh pada suasana anaerob. Hasil uji sifat kimiawi bakteriosin isolat 15B menunjukkan hasil uji Ninhidrin positif, uji Molisch negatif, dan uji Lowry positif dengan konsentrasi protein 0,11 µg/ml. Hasil karakterisasi sifat fisik dengan menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) menunjukkan bahwa hasil uji negatif. Uji aktivitas antimikroba menunjukkan bakteriosin isolat 15B memiliki efektivitas hambatan sebesar 35,82%.

Kata kunci: aktivitas antimikroba, bakteriosin, bakteri asam laktat, fisikokimia

### **ABSTRACT**

Lactic acid bacteria (LAB) is a group of Gram-positive bacteria, in the shape of coccus or bacilli and catalase-negative and also have the ability to produce lactic acid. LAB is also a microorganism which is not toxic and has the ability to produce antimicrobial compounds, known as bacteriocins. This research aims to determine the physicochemical characteristic and antimicrobial activities of bacteriocin isolated from isolates 15B originated from the bali cattle'colon. This study began by reculture of isolates 15B and followed by cultivating the isolates, isolating, producing, and precipitating of bacteriocins. The physical and chemical properties of the bacteriocins were also tested before, antimicrobial activity test was conducted. The result of the cultivation showed that isolates 15B was a lactic acid bacteria characterized by staining as Gram positive, negative catalase test and growing in anaerobic condition. The result of chemical test, showed that bacteriocins producing isolates 15B were positive on Ninhydrin test, negative on Molisch test, and positive on Lowry test with 0,11 µg/ml concentration. Physical properties test using SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) showed negative result and antimicrobial activity test showed that the bacteriocin from isolates 15B has 35,82% effectiveness of inhibition.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, lactic acid bacteria, physicochemical

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang dapat memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat. BAL didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri Gram positif yang berbentuk kokus atau batang dan tidak berspora. Produk utama dari BAL pada fermentasi glukosa atau sukrosa adalah asam laktat, namun banyak laporan ilmiah yang membuktikan bahwa bakteri BAL ini mampu menghasilkan metabolit asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang bersifat sebagai antimikroba (Leroy, 2007 dalam Suarsana, 2011). BAL dapat diisolasi dari berbagai sumber alam maupun selama proses fermentasi beberapa makanan. Selain itu bakteri asam laktat juga dapat digunakan sebagai sumber probiotik (Suardana, 2009).

BAL tidak menghasilkan toksin dan tidak bersifat toksik, oleh karena itu BAL termasuk mikroorganisme yang aman apabila ditambahkan ke dalam bahan pangan. Karena kemampuannya tersebut, BAL juga dikenal sebagai *food grade microorganisms* atau *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Meningkatkan kualitas higienis dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen merupakan manfaat lain dari bakteri asam laktat (Ouwehand dan Vesterlund, 2004). BAL menghasilkan komponen antimikroba yang dapat digunakan sebagai biopreservatif dan mampu menggantikan pengawet kimia pada bahan pangan, yakni bakteriosin (Savadogo *et al.*, 2006). Bakteriosin merupakan senyawa protein yang dieksresikan oleh bakteri yang bersifat dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama yang memiliki kekerabatan erat secara filogenik (Suardana, 2013). Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga baik digunakan sebagai biopreservatif yaitu: (i) bukan bahan toksik dan mudah mengalami degradasi oleh enzim proteolitik karena merupakan senyawa protein; (ii) tidak membahayakan

mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan; (iii) dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pengawet pangan; (iv) penggunaannya fleksibel; dan (v) 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).

Penelitian sebelumnya telah didapatkan 19 isolat bakteri asal kolon sapi bali. Beberapa isolat telah diteliti positif merupakan BAL, mampu menghasilkan bakteriosin, dan mempunyai potensi antimikroba terhadap bakteri indikator *E. coli* dan *S. aureus* yang ditandai dengan adanya diameter hambatan. Oleh karena itu, tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter fisikokimia dari BAL Isolat 15B dan kemampuannya sebagai antimikroba.

## METODE PENELITIAN

### Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri asam laktat (BAL) isolat 15B hasil isolasi dari kolon sapi bali yang berdasarkan hasil penelitian awal diketahui memiliki potensi sebagai penghasil bakteriosin. Isolat bakteri asam laktat tersebut terlebih dahulu diremajakan (*reculture*) selanjutnya dilakukan pembiakan pada media MRS Agar. Koloni bakteri yang tumbuh diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan uji katalase. Bakteri asam laktat yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipresipitasi dengan menambahkan ammonium sulfat secara perlahan-lahan sambil diaduk sampai kejenuhan 70%. Setelah penambahan ammonium sulfat, supernatan kembali disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan yang didapat selanjutnya ditambahkan dengan larutan NaCl fisiologis pada perbandingan 1:1.

## Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan dengan uji Ninhidrin, uji Molisch, dan uji Lowry. Uji Ninhidrin dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya asam amino pada suatu zat yang diuji. Uji Molisch dilakukan untuk mengetahui keberadaan karbohidrat dalam suatu zat. Sedangkan uji Lowry dilakukan untuk menentukan konsentrasi protein dalam suatu sampel dengan mengukur absorpsi dengan menggunakan spektrofotometer. Karakterisasi sifat fisik bakteriosin isolat 15B dilakukan dengan cara mengukur bobot molekul bakteriosin menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*). Uji aktivitas antimikroba dari bakteriosin isolat 15B dilakukan untuk mengetahui daya hambat bakteriosin terhadap bakteri indikator yang digunakan, yakni *Bacillus cereus* FTCC 005.

## Analisis Data

Hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel dan/atau gambar. Uji aktivitas antimikroba terhadap bakteriosin terlebih dahulu dibandingkan dengan menggunakan standar kepekaan antibiotika menurut *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS) dan data hasil sensitivitas diolah sesuai dengan prosedur penelitian yang dilakukan oleh Tangopo (2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pewarnaan Gram yang dilakukan menunjukkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) isolat 15B merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk bulat (Gambar 1). Pada uji katalase BAL isolat 15B tidak menghasilkan gelembung oksigen sehingga tergolong dalam katalase negatif.

Uji Ninhidrin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu. Hal itu menunjukkan bahwa bakteriosin dari isolat 15B tersebut merupakan senyawa asam amino (Gambar 2). Pada uji Molisch menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya cincin berwarna ungu pada

larutan bakteriosin (Gambar 3), dengan demikian maka dapat disimpulkan bahwa larutan bakteriosin dari BAL isolat 15B ini bukan merupakan senyawa karbohidrat. Uji Lowry, pada pembacaan menggunakan spektrofotometer didapatkan nilai OD bakteriosin 15B adalah 0,126. Dengan menggunakan rumus dari persamaan  $y = 1.317x - 0.0166$ ,  $R^2 = 0.9982$ , maka dapat diketahui konsentrasi protein bakteriosin isolat 15B sebesar 0,11  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil uji SDS-PAGE menunjukkan hasil negatif, yang ditandai dengan tidak terlihatnya pita protein dari sampel yang diuji (Gambar 4). Sedangkan untuk uji aktivitas antimikroba, gambaran zona hambat yang terbentuk seperti pada Gambar 5 dan hasil pembacaannya pada Tabel 1.



Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram BAL Isolat 15B (Tanda panah menunjukkan bakteri berbentuk bulat dan merupakan Gram positif)

Pada penelitian yang telah dilakukan terhadap bakteri asam laktat isolat 15B menunjukkan bahwa BAL isolat 15B merupakan bakteri Gram positif dan memiliki hasil uji katalase negatif. Menurut Hassan (2006) bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang atau bulat, dan pada umumnya tidak memproduksi enzim katalase. Bakteri Gram positif berwarna ungu pada saat pewarnaan Gram adalah karena bakteri ini memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, lapisan inilah yang mengikat zat warna kristal violet (Nuryady *et al.*, 2012)

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antimikroba dari bakteriosin asal BAL isolat 15B

Bakteriosin	Diameter Zona Hambatan (cm)					
	1	2	3	4	5	6
1	0,61	0,67	0,64	0,62	0,61	0,73
2	0,68	0,66	0,71	0,69	0,65	0,63
3	0,64	0,63	0,62	0,61	0,67	0,62
<b>Rataan</b>	0,64	0,65	0,66	0,64	0,64	0,66
<b>Kontrol positif</b>	1,70	1,61	2,01	1,91	1,90	1,81
<b>Kontrol negatif</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Efektivitas hambatan (%)</b>	37,85	40,58	32,67	33,51	33,86	36,47
<b>Rataan</b>	35,82 %					

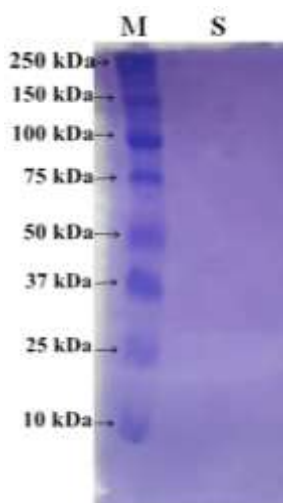


Gambar 2. Hasil uji Ninhidrin terhadap bakteriosin dari BAL isolat 15B

Ket: A (Kontrol negatif) dan B (hasil uji positif)

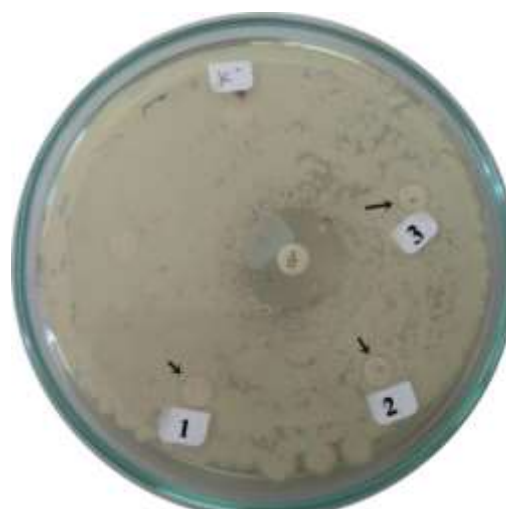


Gambar 3. Hasil uji Molisch terhadap bakteriosin dari BAL isolat 15B



Gambar 4. Hasil uji SDS PAGE bakteriosin dari BAL isolat 15B

Ket: M= Marker protein; S= Sampel



Gambar 5. Hasil uji aktivitas antimikroba dari bakteriosin isolat 15B terhadap *Bacillus cereus* FTCC 005

Ket: 1,2,3= bakteriosin isolat 15B; (K-)= kontrol negatif (Akuades steril); (kP)= kontrol positif (*streptomycin*)

Pada uji Ninhidrin warna ungu pada larutan disebabkan karena adanya reaksi yang terjadi antara  $\alpha$ -amino acids dengan ninhidrin. Senyawa ninhidrin yang bersifat oksidasi tinggi menyebabkan terjadinya dekarboksilasi oksidatif terhadap  $\alpha$ -amino acids, menghasilkan hidrindantin, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, dan aldehyd. Bergabungnya senyawa NH<sub>3</sub>, hidrindantin dan ninhidrin tersebutlah yang memberikan warna biru/ungu pada larutan (Senese, 2010). Uji Ninhidrin bertujuan untuk membuktikan keberadaan asam amino bebas dalam zat yang diuji. Uji Molisch dilakukan untuk mengetahui apakah suatu zat yang mengandung karbohidrat. Uji Molisch menurut Nigam dan Ayyagari (2007) menggunakan  $\alpha$ -naphthol yang dapat membantu dalam memberikan warna ungu/violet pada suatu senyawa karbohidrat. Sedangkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> akan membantu menghidrolisis karbohidrat sehingga mengalami dehidrasi menjadi gugus furfural. Gugus furfural inilah yang akan membentuk cincin berwarna ungu apabila uji positif mengandung karbohidrat. Konsentrasi protein bakteriosin dari BAL isolat 15B diuji dengan melakukan uji Lowry menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Pada pembacaan menggunakan spektrofotometer didapatkan nilai OD bakteriosin 15B adalah 0,126. Dengan menggunakan rumus persamaan konsentrasi protein standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) maka dapat diketahui konsentrasi protein bakteriosin isolat 15B sebesar 0,11  $\mu$ g/ml.

Pengukuran bobot molekul bakteriosin asal bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE. Uji yang telah dilakukan ini menunjukkan hasil negatif. Hal ini kemungkinan disebabkan karena konsentrasi sampel yang dimasukkan ke dalam sumuran pada saat uji terlalu sedikit, yakni 5  $\mu$ l. Sedangkan Rachmania *et al.* (2017) dalam penelitiannya menggunakan sampel sebanyak 20  $\mu$ l untuk satu sumuran. Ukuran molekul protein dan konsentrasi gel juga menentukan laju pergerakan pita

protein, semakin kecil ukuran molekul protein menyebabkan laju pergerakan pita protein akan semakin cepat maka dari itu diperlukan konsentrasi gel poliakrilamid yang lebih tinggi (Firmansyah, 2014). Pada penelitian ini persentase gel yang digunakan adalah sebesar 12,5%. Pada umumnya persentase gel yang digunakan pada pengujian bakteriosin adalah sebesar 15% karena bakteriosin memiliki berat molekul yang rendah, seperti penelitian yang dilakukan oleh Karthikeyan dan Santhosh (2009) yang menggunakan resolving gel dengan konsentrasi 15%.

Bottone (2010), menyatakan bahwa *Bacillus cereus* merupakan bakteri Gram positif, bersifat motil, berbentuk batang, mampu menghasilkan spora, dan bersifat aerob atau fakultatif anaerob. Selain dapat menghambat bahkan membunuh bakteri-bakteri yang spesiesnya berdekatan dengan bakteri penghasilnya, bakteriosin juga dilaporkan memiliki aktivitas spektrum yang luas terhadap bakteri Gram positif (Garneau *et al.*, 2002 dalam Suarsana, 2011). Rata-rata efektivitas hambatan yang didapatkan adalah sebesar 35,82 %.

## SIMPULAN

### Simpulan

Bakteriosin asal bakteri asam laktat isolat 15B mengandung asam amino bebas, hal ini ditunjukkan dengan hasil positif pada uji Ninhidrin. Sedangkan pada uji Molisch menunjukkan hasil negatif yang berarti bahwa bakteriosin yang diuji tidak mengandung senyawa karbohidrat. Konsentrasi protein dari bakteriosin asal bakteri asam laktat isolat 15B yang diuji menggunakan uji Lowry adalah sebesar 0,11  $\mu$ g/ml, hal ini berarti dalam setiap ml sampel yang diuji mengandung 0,11  $\mu$ g protein. Pada uji aktivitas antimikroba bakteriosin hasil isolasi menunjukkan terbentuknya zona hambat terhadap bakteri indikator yaitu *Bacillus cereus* FTCC 005 dengan rata-rata efektivitas hambatan sebesar 35,82 %.

## Saran

Adanya hasil uji negatif pada uji SDS-PAGE pada penelitian ini maka disarankan untuk dilakukan uji SDS-PAGE yang serupa dengan tingkat konsentrasi *resolving gel* yang lebih besar.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada kepala Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana atas fasilitas yang telah diberikan selama penelitian, serta kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23(2): 382-398.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.*, 71: 1-20.
- Firmansyah WE. 2014. Biokimia dan Analisis Pangan Elektroforesis SDS PAGE. Laporan Praktikum, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang
- Hassan ZH. 2006. Isolasi *Lactobacillus*, bakteri asam laktat dari feses dan organ saluran pencernaan ayam. *Proc. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*.
- Karthikeyan V, Santhosh SW. 2009. Study of bacteriocin as a food preservatif and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pak. J. Nutr.*, (4): 335-340.
- Leroy LDVF. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13:194-199.
- Nigam A, Ayyagari A. 2007. Lab Manual in Biochemistry, Immunology, and Biotechnology. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited: New Delhi.
- Nuryady MM, Istiqomah T, Faizah R, Ubaidillah S, Mahmudi Z, Sutoyo. 2013. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal Yogurt. *UNEJ J.*, 1(5): 1-11.
- Ouwehand AC, Vesterlund S. 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria *dalam* Salminen, S., AV Wright and AC Ouwehand (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 3<sup>rd</sup> Ed. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel.
- Rachmania, RA, Wahyudi P, Wardani AM, Insani DR. 2017. Profil berat molekul enzim protease buah nanas (*Ananas comosus L.Merr*) dan pepaya (*Carica papaya L.*) menggunakan metode SDS-PAGE. *ALCHEMY J. Penelitian Kimia*, 13(1): 52-65.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. 2006. Bacteriocin and Lactic Acid Bacteria. A Minireview. *African J. Biotechnol.*, 5(9): 678-683.
- Senese F. 2010. What is a Simple Test for the Presence of amino acids?. General Chemistry Online. <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/organic/faq/amino-acid/test.shtml>. Diakses pada 12 Juni 2016.
- Suardana IW, Suada IK, Sukada IM, Suarsana IN. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat SR9 Asal Cairan Rumen Sapi Bali Sebagai Kandidat Unggul Probiotik. *J. Ilmiah Kedokteran*, 8(2): 100.
- Suardana IW. 2013. Potensi isolat *Lactobacillus brevis* asal cairan rumen sapi bali sebagai sumber senyawa antimikroba. *Proc. Seminar Nasional Sapi Bali*. Pp: 87-97.
- Suarsana IN. 2011. Karakterisasi fisikokimia bakteriosin yang diekstrak dari Yoghurt. *Bul. Vet. Udayana*, 3(1): 1-8.