

ISSN : 0854 – 4204

WICAKSANA

JURNAL LINGKUNGAN & PEMBANGUNAN



Vol. 18, No. 1 Hlm. 1 - 110
Februari 2009

DAFTAR ISI

Pengantar Redaksi.....	i
Ucapan Terimakasih.....	ii
Daftar Isi.....	iii
Naskah Lingkungan	
Perbandingan Kuat Tekan Beton Antara Penggunaan Limbah Batu Pilah Singaraja dengan Batu Pecah Klungkung Sebagai Agregat Kasar. <i>I Ketut Sutapa</i>	1-7
Beberapa Faktor Penyebab Kenaikan Temperatur Kerja Mesin Pada Sistim Pendingin Air Tertutup. <i>I Komang Rasmariadi dan I Nengah Dharmasusila</i>	8-13
<i>Continuity and Change in Balinese House in Blimbingsari Jembrana West Bali.</i> <i>I Made Sukadana</i>	14-21
Perbandingan Penggunaan Limbah Batu Candi Muncan Dengan Batu Pecah Klungkung Terhadap Kuat Tekan Beton. <i>I Nyoman Sutapa dan I Ketut Sutapa</i>	11-27
Analisa Pengolahan Limbah Cair Pencelupan / Pewarnaan Dengan Metode Sedimentasi di Kabupaten Klungkung Bali. <i>I Nyoman Sutarna</i>	28-34
Struktur Permintaan dan Penawaran Produk Pertanian di Bali. <i>Made Kembar Sri Budhi</i>	35-42
Pemanfaatan Daun Pepaya, Daun Katuk dan Kombinasinya Terhadap Kualitas Daging Itik Bali Jantan Umur 11 Minggu. <i>Ni Ketut Sri Rukmini</i>	43-49
Deteksi Senyawa Antimikroba Bakteriosin Bakteri Asam Laktat Selama Fermentasi Ikan Peda. <i>Ni Made Ayu Suardani Singapurwa</i>	50-58
Naskah Pembangunan	
Peranan <i>Activity Based Management (ABM)</i> Dalam Menciptakan <i>Strategic Cost Management (SCM)</i> Dalam Dunia Usaha. <i>I Ketut Selamat</i>	59-65
Hubungan Kepemimpinan Terhadap Peningkatan Etos Kerja Dosen di Lingkungan STIE AMM Mataram. <i>I Made Murjana</i>	66-70
Fungsi Harga Pokok Pesanan Untuk Penentuan Proses dan Pembebanan Biaya Produksi Patung Arjuna Dalam Media Keramik, Serta Implikasi Harga Jual Pada UPT PSTKP Bali-BPPT. <i>I Nyoman Normal</i>	71-79
Peningkatan Penggunaan Produksi Dalam Negeri Menuju Peningkatan Kemandirian Bangsa. <i>Luh Putu Aswitari</i>	80-87
Efektivitas <i>Price Limit</i> di Bursa Efek Jakarta. <i>Luh Putu Mahyuni</i>	88-95
Perbedaan Kinerja Keuangan Perusahaan Sebelum dan Sesudah <i>Merger</i> dan Akusisi Horisontal. <i>Made Rusmala Dewi S</i>	96-103
Membangun dan Membina Usaha Kecil Menengah Sebagai Peluang Berwirausaha. <i>Ni Ketut Sukasih</i>	104-110

DETEKSI SENYAWA ANTIMIKROBA BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT SELAMA FERMENTASI IKAN PEDA

DETECTION ANTIMICROBIAL SUBSTANCES OF LACTIC ACID BACTERIA IN PEDAS FISH FERMENTED

NI MADE AYU SUARDANI SINGAPURWA

Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa
Jln. Terompong 36 Tanjung Bungkak Denpasar 80235
Tlp. (0361) 223858 Fax (0361) 235076

Received April, 22, 2008 / Accepted July, 7, 2008

Lactic acid bacteria are used to preserve variety of food because it can produce antimicrobial substances such as organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, and bacteriocins which can inhibit against several food spoilage microbia and food pathogens. Pedas fish fermented research aim to know which is lactic acid bacteria genus have a role, bacteriocins antimicrobial substances produce and bacteriocins capability to inhibit pathogen bacteria. The identification of lactic acid bacteria is doing until the genus level. Antimicrobial substances bacteriocins produce are doing by growth isolates in MRS Broth medium and MRS Broth medium without glucose and meat extract. Bacteriocins detect can be seen by protein bands in SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). The bacteriocins capability inhibit pathogen bacteria Escherichia coli can be seen on the zone of inhibition. Lactobacillus and Leuconostoc are lactic acid bacteria which have a role in pedas fish fermented. Each Lactobacillus and Leuconostoc can produce bacteriocins with weight molecule 30,3 kDa and 34,4 kDa, also can inhibit growth E. coli.

Key words : Lactic Acid Bacteria, bacteriocins, SDS PAGE

PENDAHULUAN

Kerusakan ikan dapat terjadi secara biokimia maupun mikrobiologi. Kerusakan biokimia terutama disebabkan adanya enzim dan reaksi kimia yang masih berlangsung pada tubuh ikan segar, sedangkan kerusakan mikrobiologi disebabkan adanya aktivitas mikroba, terutama bakteri perusak. Kerusakan ikan oleh bakteri terutama disebabkan oleh bakteri gram negatif dari genus *Pseudomonas* dan *Actinobacter*, serta genus *Corynebacterium* dan *Micrococcus* (Mahyudanil, 2003), oleh karena itu perlu dilakukan berbagai usaha untuk mencegah terjadinya kerusakan mikrobiologi.

Bakteri asam laktat mempunyai peranan penting dalam proses fermentasi makanan, seperti pada fermentasi terasi dan ikan pedas. Selama proses fermentasi, bakteri ini memetabolisme karbohidrat sebagai produk utamanya, menghasilkan asam laktat (Mahyudanil, 2003). Bakteri asam laktat mempunyai pengaruh pengawetan karena menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan berbagai mikroba. Sebagian besar pengaruh antimikroba ini disebabkan oleh pembentukan asam laktat dan asam asetat serta penurunan pH yang dihasilkan (Kusumawati, 2000) yang dapat menghambat perkembangan bakteri yang hidup pada pH netral maupun alkali. Tan *et al.*, (2001)

telah mengisolasi dan mempurifikasi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat pada Agos Os, suatu produk terfermentasi di Filipina yaitu campuran daging babi dengan ketela rambat. Bakteriosin yang diisolasi dihasilkan *Enterococcus faecalis* VRE 1492. Isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteriosin yang dihasilkan oleh mikroba diperoleh bahwa terdapat 6 isolat pada fermentasi Agos Os selama 3 – 7 hari.

Kemampuan bakteri asam laktat pada bahan pangan terfermentasi terutama pada ikan terfermentasi untuk memproduksi substansi antimikroba yang potensial sebagai pengawet makanan belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian deteksi senyawa antimikroba bakteriosin bakteri asam laktat pada fermentasi ikan peda dan kemampuannya menekan pertumbuhan bakteri patogen.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pascasarjana Bioteknologi, Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian dan Laboratorium Analitik Universitas Udayana Denpasar.

Bahan – bahan yang digunakan terdiri dari ikan kembung yang dibeli di pasar Badung Denpasar, garam, aquades, media pertumbuhan MRS broth, MRSA, EMBA, serta untuk pengamatan bakteriosin yang terbentuk, dengan SDS PAGE. Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat untuk membuat ikan peda seperti toples plastik berdiameter 30 cm, tinggi 35 cm, besek bambu, peralatan SDS PAGE serta untuk pengujian senyawa antimikroba bakteriosin yang terdapat pada ikan peda.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan mengumpulkan data dengan pengamatan langsung dan melakukan serangkaian uji-uji yang diperlukan. Penelitian dilakukan secara bertahap, yaitu pembuatan ikan peda, tahap deteksi terbentuknya senyawa antimikroba

bakteriosin pada ikan peda, serta kemampuan bakteriosin menekan bakteri patogen.

Pembuatan ikan Peda dilakukan melalui dua tahap, yaitu proses penggaraman dan proses fermentasi. Pada proses penggaraman, sebanyak 12 ekor (2 kg) ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) dibuang insang dan isi perutnya, digarami sebanyak 20% berat ikan, garam diletakkan berselang-seling dalam toples plastik dan bagian atas ditutup dengan garam, wadah ditutup rapat. Setelah proses penggaraman yang berlangsung selama tiga hari, ikan dicuci dengan air garam yang terdapat pada proses penggaraman dan ditiriskan. Ikan yang telah bersih dilapisi garam dapur, disusun dalam wadah besek dengan dialasi jerami, pada bagian atas ditutup garam dan wadah ditutup rapat. Selama fermentasi yang berlangsung selama 9 hari, ikan dalam wadah bambu disimpan pada tempat yang bersih (Rahayu, 1993 ; Afrianto dan Liviawaty, 1993 ; Murniyati dan Sunarman, 2000).

Isolat bakteri asam laktat diidentifikasi berdasarkan penotipe. Identifikasi berdasarkan penotipe meliputi : morfologi sel, pengecatan gram, uji katalase, produksi gas dari glukosa, dan uji motilasi. Data yang diperoleh untuk penotipe dibandingkan dengan deskripsi standar menurut Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986).

Total bakteri asam laktat ditentukan dengan metode permukaan (Fardiaz, 1992). Sebanyak 10 g sampel dihancurkan dalam wadah steril dan dimasukkan ke dalam botol pengencer yang telah berisi 90 ml larutan Bacteriological Pepton 0,1% steril, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . kemudian dikocok hingga homogen, selanjutnya dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml Bacteriological Pepton 0,1% steril, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian seterusnya untuk mendapatkan pengenceran yang lebih besar, sampai pengenceran 10^{-8} . Dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , dipipet 1 ml ke dalam cawan Petri, kemudian dituang media MRSA

sebanyak 15 – 20 ml. Komposisi MRSA terdiri dari 10 g/l peptone, 10 g/l ekstrak daging, 5 g/l ekstrak yeast, 2 g/l K_2HPO_4 , 2 g/l amonium sitrat, 20 g/l glukosa, 5 g/l sodium asetat, 0,58 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 0,28 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Cawan Petri yang sudah ditanami selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator dengan cara terbalik dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni-koloni yang tumbuh pada agar cawan Petri dihitung dengan metode angka lempeng total.

Total *E. coli* ditentukan dengan metode permukaan (Fardiaz, 1992), sebanyak 10 g sampel dihancurkan dalam wadah steril dan dimasukkan ke dalam botol pengencer yang telah berisi 90 ml larutan Bacteriological Pepton 0,1% steril, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Dikocok hingga homogen, selanjutnya dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml Bacteriological Pepton 0,1 % steril, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian seterusnya untuk mendapatkan pengenceran yang lebih besar sampai pengenceran 10^{-4} . Dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dipipet 1 ml ke dalam cawan Petri, kemudian dituang media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*) sebanyak 15 – 20 ml. Komposisi EMBA terdiri dari 10 g/l peptone, 10 g/l laktose, 2 g/l K_2HPO_4 , 0,4 g/l eosin, 0,065 g/l methylen blue, dan 15 g/l agar, pH $6,8 \pm 0,2$. Cawan petri yang sudah ditanami selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator dengan cara terbalik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi 24 jam, amati mikroba yang tumbuh. Adanya mikroba ini terlihat berwarna hijau metalik pada media. Koloni-koloni yang tumbuh pada agar cawan Petri dihitung dengan metode angka lempeng total.

Produksi metabolit sekunder yang merupakan senyawa antimikroba bakteriosin dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri asam laktat pada media kaya nutrisi dan media miskin nutrisi. Sebelum ditumbuhkan pada media yang berbeda, untuk menstabilkan

pertumbuhannya, koloni bakteri ditumbuhkan pada media LB cair selama 24 jam pada suhu 30°C dengan pengocokan (shaker).

Produksi metabolit sekunder dapat dilihat dengan adanya tingkat kekeruhan media pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Hasil pengukuran produksi metabolit sekunder dapat dilihat dari grafik pertumbuhan mikroba (Lay dan Hastowo, 1992). Metabolit sekunder diproduksi pada fase stasioner mendekati akhir siklus pertumbuhannya (Said, 1987; Yang and Ray, 1994). Isolat bakteri asam laktat pada media miskin nutrisi bakteri diharapkan menghasilkan metabolit sekunder. Komposisi media MRS broth yang kaya nutrisi yaitu 10 g/l Bacto pepton, 10 g/l ekstrak daging, 5 g/l ekstrak yeast, 2 g/l K_2HPO_4 , 2 g/l Amonium sitrat, 20 g/l Glukosa, 5 g/l Sodium asetat, 0,58 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,28 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, pH 6,3. Pada media miskin tidak ditambahkan ekstrak daging dan glukosa. Penumbuhan bakteri pada kedua media dilakukan selama 96 jam pada suhu 30°C dengan pengocokan (shaker) dan diperkirakan sudah mengalami pertumbuhan fase stasioner dan mendekati akhir siklus kehidupannya (Coventry *et al.*, 1997).

Isolat bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media kaya dan miskin, diambil sebanyak 1,5 ml (1 *ependorf*), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Untuk deteksi senyawa antimikroba dengan SDS PAGE, sebanyak 600 μ l supernatan ditambahkan 300 μ l sample buffer (0,01 M Tris; 2,5 % SDS, 5% Mercaptoetanol dan 25% sucrosa) dan ditambahkan pewarna 300 μ l Comassie Brilliant Blue (1 g Comassie Brilliant Blue, 200 ml metanol, 40 ml Acetic acid). Suspensi diletakkan dalam mikrotube (1,5 ml) dan divortek, diinkubasikan pada suhu 95°C selama 5 menit kemudian didinginkan. Disentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 detik, selanjutnya dilakukan pemisahan molekul-molekul protein dengan SDS-PAGE.

Prosedur yang digunakan adalah menurut Rybicki and Purves (1996) dan Bhunia *et al.*,

(1987). *Resolving gel* dengan konsentrasi 12% yang terdiri dari Acrylamide mix 2,73 ml, 1,5 M Tris pH 8,8 (2 ml), 10% SDS (0,1 ml), 10% ammonium persulphate (0,1 ml), 0,01 ml Temed dan 4,57 ml distilled water dituang ke dalam cetakan gel. Ruang untuk penempatan sisir dan stacking gel disisakan ± 1 cm, setelah terjadi polimerisasi (30 menit) tuangkan stacking gel dengan konsentrasi 4% yang berisi 6,4 ml distilled water, 0,9 ml acrylamide mix, 0,5 M Tris pH 6,8 sebanyak 2,5 ml; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% ammonium persulphate dan 0,01 ml Temed, kemudian masukkan sisir ke dalam *stacking gel* secara perlahan, setelah polimerisasi *stacking gel* (30 menit) sisir diangkat dan gel dipasang pada alat elektroforesis, tambahkan buffer elektroforesis pH 8,8 pada bagian atas dan dasar alat elektroforesis. Buffer elektroforesis terdiri dari Tris 6,0 g; glycine 28 g, SDS 1,0 g yang telah dilarutkan pada distilled water sehingga volume menjadi 1000 ml. Protein sampel dimasukkan pada masing-masing well sebanyak 40 μ l, kemudian dilakukan elektroforesis pada voltage 50 V dan voltage ditingkatkan 70 V setelah sampel masuk ke resolving gel, dan elektroforesis dihentikan bila pewarna telah sampai pada bagian bawah resolving gel.

Gel direndam pada larutan Coomassie Brilliant Blue selama 1 – 2 jam yang terdiri dari campuran Coomassie Brilliant Blue (CBB) 1 g, Methanol 200 ml, Acetic Acid 200 ml yang telah dilarutkan pada distilled water sehingga volume menjadi 400 ml CBB berikatan dengan molekul protein bila dicuci dengan metanol sehingga pita-pita protein tampak jelas, kemudian gel dicuci dengan destaining solution yang berisi Methanol 250 ml, Acetic Acid 70 ml yang telah dilarutkan pada distilled water sehingga volume 1000 ml selama 30 menit untuk pencucian pertama, untuk pencucian berikutnya dilakukan selama 12 jam (*over night*) kemudian dicuci dengan aquadest, dan gel yang sudah dicuci tersebut disimpan pada kantong plastik, box plastik dan dapat dilihat hasil elektroforesis dengan melihat posisi pita-pita (*band*) dari tiap sampel dan membandingkan

dengan protein marker yang telah dilarutkan pada marker buffer pH 6,8 yang mengandung 0,01 M Tris; 2,5 % SDS dan Mercaptoethanol.

Isolat bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media kaya dan miskin, diambil sebanyak 1,5 ml (1 *eppendorf*), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diberi perlakuan berbeda, cara pertama dengan langsung diteteskan pada kertas absorbance dan diletakkan pada media EMBA yang telah berisi biakan *Escherichia coli*. Cara kedua, supernatan diberi perlakuan dengan ditambahkan Ba(OH)₂ jenuh 65% dan biarkan semalam sampai terbentuk endapan. Endapan diencerkan dengan buffer fosfat (0,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 2,9 g/l Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g/l KCl, pH7,4) dengan perbandingan 1: ½ dan dimasukkan ke tabung selofan, direndam dalam aquadest semalam. Untuk persiapan bakteri indikator, maka dilakukan pembiakan bakteri *E. coli* pada media LB selama 24 jam dan dari suspensi tersebut diambil 1 ml untuk dibiakkan dalam cawan petri dengan media agar (EMBA) sebanyak 15 – 20 ml pada suhu 45 – 50°C dan biarkan memadat. Setelah media yang berisi *E. coli* padat, maka kertas absorbance yang telah mengandung suspensi senyawa antimikroba bakteriosin diletakkan di atasnya dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam dan diamati zona yang terbentuk. Jika zona hambatan terbentuk berarti dapat dipastikan bahwa senyawa antimikroba bakteriosin memang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen *E. coli*. (Bhunia *et al.*, 1987 ; Coventry *et al.*, 1997). Data yang diperoleh dari 2 kali ulangan dianalisis secara deskripsi dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat. Pada penelitian ini diperoleh tiga isolat bakteri asam laktat, selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri asam laktat, seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Ikan Peda

Identifikasi	A (atas)	B (tengah)	C (bawah)
Uji pewarnaan Gram	Positif	positif	positif
Uji morfologi	Batang	batang	bulat
Uji motilasi	Negatif	negatif	negatif
Uji katalase	Negatif	negatif	negatif
Uji produksi gas dari glukosa	Positif	negatif	positif
Tipe fermentasi	Heterofermentatif	Homofermentatif	Heterofermentatif
Genus	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>

Tabel 2. Nilai *Optical Density* Isolat Bakteri Asam Laktat

Jam ke-	Nilai OD isolat bakteri asam laktat					
	AK	BK	CK	AT	BT	CT
0	0.059	0.052	0.630	0.028	0.032	0.012
24	1.005	0.758	0.845	0.084	0.064	0.058
36	0.995	0.845	0.895	0.081	0.069	0.072
48	0.985	0.870	0.830	0.085	0.067	0.075
54	0.965	0.870	0.790	0.081	0.065	0.076
60	0.950	0.870	0.782	0.082	0.066	0.070
66	0.945	0.870	0.718	0.078	0.071	0.069
72	0.905	0.880	0.710	0.076	0.069	0.065
78	0.885	0.860	0.692	0.074	0.061	0.063
84	0.830	0.752	0.695	0.065	0.058	0.050
90	0.815	0.728	0.660	0.051	0.055	0.042
96	0.810	0.725	0.658	0.045	0.051	0.039

Keterangan : AK = isolat *Lactobacillus* heterofermentatif (A) pada media kaya nutrisi; BK = isolat *Lactobacillus* homofermentatif (B) pada media kaya nutrisi; CK = isolat *Leuconostoc* pada media kaya nutrisi; AT = isolat *Lactobacillus* heterofermentatif (A) pada media miskin nutrisi; BT = isolat *Lactobacillus* homofermentatif (B) pada media miskin nutrisi; CT = isolat *Leuconostoc* pada media miskin nutrisi

Pada Tabel 1 dapat dilihat dari 3 isolat bakteri asam laktat pada fermentasi ikan peda, menurut Sneath *et al.*, (1989), 2 isolat diidentifikasi sebagai genus *Lactobacillus* dan 1 isolat sebagai genus *Leuconostoc*. Hasil penelitian ini mendukung pendapat Buckle *et al.* (1987), yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* dapat tumbuh cepat dengan adanya

garam dan terbentuknya asam akan menghambat organisme yang tidak dikehendaki. Karena pada fermentasi ikan peda diawali dengan proses penggaraman, maka bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* yang dapat berkembang.

Bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi 2, yaitu yang bersifat homofermentatif dan

heterofermentatif. (Buckle *et al.*, 1987 ; Jay, 1992 ; Schlegel and Schmidt, 1994). Genus *Lactobacillus* dapat bersifat homofermentatif atau heterofermentatif, sedangkan *Leuconostoc* bersifat heterofermentatif. Pada penelitian ini, genus *Streptococcus* dan *Pediococcus* tidak terdapat selama fermentasi. Hal ini disebabkan karena pada fermentasi ikan peda menggunakan konsentrasi garam yang cukup tinggi, sehingga hanya genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* yang mampu berkembang pada kadar garam yang tinggi (Buckle *et al.*, 1987).

Produksi Metabolit Sekunder (Bakteriosin). Produksi metabolit sekunder (bakteriosin) dilakukan dengan pengukuran tingkat kekeruhan isolat yang ditumbuhkan pada media kaya dan miskin dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, data nilai *optical density* dapat dilihat pada Tabel 2.

Untuk dapat menghasilkan metabolit sekunder yang merupakan substansi antimikroba bakteriosin, maka pertumbuhan bakteri asam laktat berada pada fase stasioner mendekati akhir siklus pertumbuhannya. Metabolit sekunder dikeluarkan oleh mikroba tidak untuk pertumbuhannya, tetapi untuk dapat mempertahankan hidupnya. (Buckle *et al.*, 1987 ; Said, 1987 ; Schlegel and Schmidt, 1994 ; Yang and Ray, 1994). Produksi metabolit sekunder bakteriosin tersebut dapat maksimal, diatas 60% setelah sel pada phase stasioner (Yang and Ray, 1994).

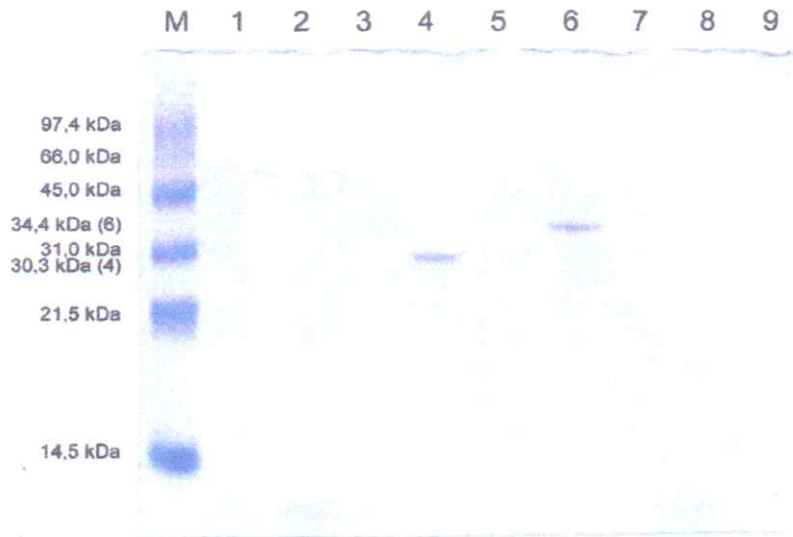
Substansi antimikroba bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat dari fermentasi ikan peda diamati pada kedua media pertumbuhan isolat bakteri asam laktat yaitu media kaya nutrisi dan media miskin nutrisi. Pada pengamatan bakteriosin dengan SDS PAGE pada inkubasi 72 jam tidak diperoleh pita-pita protein. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan peda belum mampu membentuk bakteriosin, dan baru diproduksi pada inkubasi 96 jam (Coventry *et al.*, 1997).

Deteksi senyawa antimikroba bakteriosin dengan SDS-PAGE. Dari isolat yang diambil pada media pada pertumbuhan

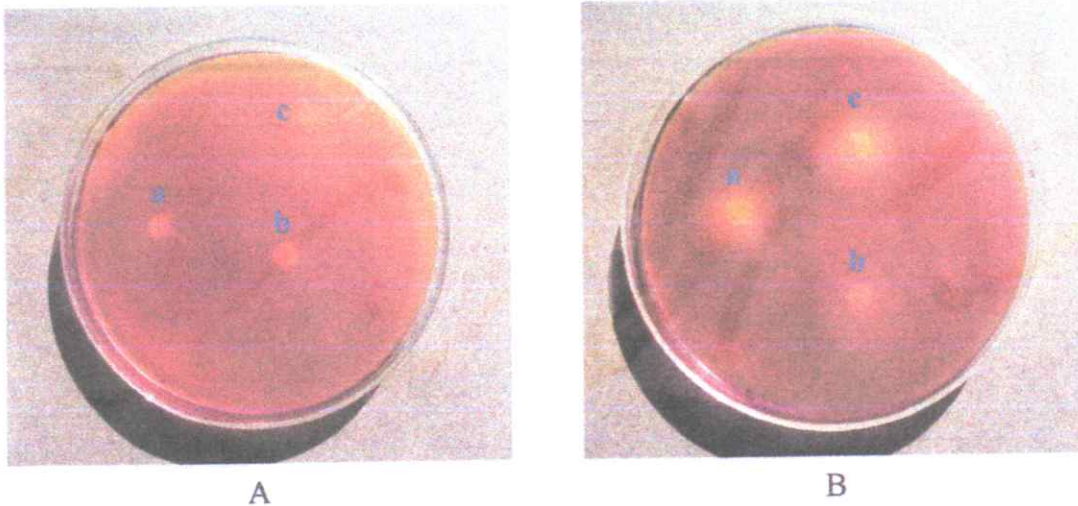
pada fase stasioner, dilakukan pengukuran pita-pita protein dengan SDS PAGE. Dari hasil SDS PAGE diperlihatkan bahwa dari 3 isolat bakteri asam laktat yang berperan pada fermentasi ikan peda hanya 2 isolat yang memproduksi bakteriosin yaitu isolat yang ditumbuhkan pada media miskin nutrisi. Isolat *Lactobacillus* heterofermentatif dan *Leuconostoc* dapat memproduksi senyawa antimikroba bakteriosin pada media miskin nutrisi, masing-masing 30,3 kDa dan 34,4 kDa, seperti pada Gambar 1. Hasil penelitian ini mendukung pernyataan Bhunia *et al.*, (1987) yang menyatakan bahwa berat molekul substansi antimikroba yang dihasilkan bakteri asam laktat adalah 2700 – 100000 Dalton.

Analisis protein dengan menggunakan SDS-PAGE dapat dilihat perubahan spesifik yang terjadi pada protein dengan berat molekul tertentu. Ketajaman pita protein hasil SDS PAGE berhubungan dengan konsentrasi protein (Ilminingtyas *et al.*, 2000). Menurut Bhunia *et al.* (1988) bakteriosin merupakan protein atau protein kompleks yang biasanya memiliki berat molekul kecil, dan telah ditemukan berat molekul Pediocin PA-1 sebesar 16,5 kDa, yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* PAC-1. Sedangkan Ray (1993) menyatakan bahwa berat molekul Nisin 3510 Da dengan 34 asam amino, Pediocin AcH 4628 Da dengan 44 asam amino. Djaafar *et al.* (1996) juga telah mengisolasi metabolit sekunder bakteri asam laktat *Lactobacillus casei*, dan mendapatkan berat molekul 14.700.

Uji aktivitas senyawa antimikroba bakteriosin terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Pada media miskin nutrisi, kondisi pertumbuhan isolat bakteri asam laktat tertekan, sehingga mampu memproduksi metabolit sekunder. Zona hambatan dapat terbentuk pada kertas absorbance yang mengandung senyawa antimikroba bakteriosin yang terdapat pada media miskin nutrisi, baik yang diendapkan dengan Ba(OH)₂ maupun tanpa Ba(OH)₂. Bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat *Lactobacillus* heterofermentatif dan isolat



Gambar 1. Analisis Pita-pita Bakteriosin dari Isolat Bakteri Asam Laktat Ikan Peda. M = Marker, lajur 1 dan 7 isolat *Lactobacillus* heterofermentatif (A) pada media kaya nutrisi, lajur 2 dan 8 isolat *Lactobacillus* homofermentatif (B) pada media kaya nutrisi, lajur 3 dan 9 isolat *Leuconostoc* pada media kaya nutrisi, lajur 4 isolat *Lactobacillus* heterofermentatif (A) pada media miskin nutrisi, lajur 5 isolat *Lactobacillus* homofermentatif (B) pada media miskin nutrisi, lajur 6 isolat *Leuconostoc* pada media miskin nutrisi



Gambar 2. Pengujian Aktivitas Bakteriosin Terhadap Pertumbuhan *E. coli* dengan Terbentuknya Zona Hambatan. A. Pada media kaya nutrisi, B. Pada media miskin nutrisi. a). Bakteriosin dari *Lactobacillus* Heterofermentatif, b). Bakteriosin dari *Lactobacillus* Homofermentatif, c). Bakteriosin dari *Leuconostoc*.

Leuconostoc, mampu membentuk zona hambatan. Pada media kaya nutrisi, tidak terbentuk zona hambatan, karena isolat bakteri asam laktat masih dapat hidup pada kondisi normal, dengan nutrisi yang masih mencukupi untuk kelangsungan hidupnya.

Terbentuknya zona hambatan menunjukkan kemampuan metabolit sekunder bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat untuk menghambat bakteri patogen. Pengujian aktivitas antimikroba dibuktikan dengan terbentuknya cincin-cincin hambatan di atas cawan agar biak yang ditumbuhi secara padat dengan *E. coli*, akan nampak tidak terjadi pertumbuhan di sekeliling koloni. Hasil penelitian ini mendukung pendapat Davidson and Braner (1991) dan Tan *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa *E. coli* dapat dihambat oleh bakteriosin yang dapat diproduksi oleh bakteri asam laktat genus *Streptococcus* dan *Pediococcus*. Schlegel and Schmidt (1994) juga menyatakan bahwa antimikroba berdifusi keluar dari koloni ke dalam agar dan mengakibatkan pembentukan cincin-cincin hambatan di sekitar pertumbuhan bakteri yang padat.

Bakteriosin banyak diterapkan sebagai antimikroba bahan pangan, karena efektif menghambat dan mematikan sejumlah bakteri patogen pada bahan pangan. Bakteriosin efektif melawan pertumbuhan bakteri gram positif, bakteri gram negatif, dan bakteri patogen (Bhunia *et al.*, 1988 ; Ray, 1993 ; Djaafar *et al.*, 1995 ; Tan *et al.*, 2001 ; Anon, 2003).

SIMPULAN

Isolat bakteri asam laktat *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* pada fermentasi ikan peda dapat memproduksi substansi antimikroba bakteriosin dengan berat molekul masing-masing 30,3 kDa dan 34,4 kDa. Substansi antimikroba bakteriosin tersebut mampu menekan pertumbuhan mikroba patogen *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2003. Industrial food biotechnology <http://imol.vub.ac.be/IMDO/Page51.html>.
- Bhunia, A.K., M.C. Johnson, and B. Ray. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Industrial Microbiol.* 2:319-322.
- Bhunia, A.K., M.C. Johnson, and B. Ray. 1988. Purification, characterization and microbial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 261 – 268.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet dan M. Wootton. 1987. Ilmu Pangan. Penerjemah Purnomo dan Adiono. UI Press. Jakarta.
- Coventry, M.J., J.B. Gordon, A. Wilcock, K. Harkmark, B.E. Davidson, M.W. Hickey, A.J. Hillier and J. Wan. 1997. Detection of Bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83: 248-258.
- Davidson, P.N. and A.L. Branen. 1991. Antimicrobials in Food, Macel Dekker, Inc. New York.
- Djaafar, T.F., E. S. Rahayu, D. Wibowo, dan S. Sudarmadji. 1995. Substansi Antimikroba Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus casei* subsp, *Rhamnosus* TGR-2 yang diisolasi dari Growol, Inst. Penel. dan Pengkajian Tekn. Pert. Yogyakarta.
- Fardiaz, S. 1992. Analisis Mikrobiologi Pengolahan Pangan, PAU Pangan Gizi IPB, Bogor.
- Ilimingtyas W.H., D., S. Hadiwiyoto, D. Wisesa, dan S. Naruki. 2000. Pembentukan Fraksi-fraksi Protein Selama Fermentasi Peda. *Agrosains* 13(1): 1-18. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Jay, J.M. 1992. Lactic Acid Bacteria. Modern Food Microbiology. Van Nostran Reinhold New York.

- Kurniati, M.M.V. dan S.I. Wanandi. 2001. Pemisahan Protein dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamid SDS, Widya Medika, Jakarta.
- Kusumawati, N. 2000. Peranan Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat *Listeria monocytogenes* Pada Bahan Pangan, Jurnal Tek. Pangan dan Gizi.1(1): 14-26.
- Lactospore. 2003. Background Information on Lactic Acid Bacteria. <http://www.lactospore.com/back.html>.
- Mahyudani. 2003. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Produk Penggaraman Ikan dan Ikan Terfermentasi. http://www.geocities.com/himatepa_uisu/agritech3.html.
- Murniyati, A.S, dan Sunarman. 2000. Pendinginan, Pembekuan, dan Pengawetan Ikan. Kanisius, Yogyakarta.
- Rahayu, S. 1993. Pengolahan Ikan Peda dalam Kumpulan Hasil-hasil Penelitian Pasca Panen Perikanan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Jakarta.
- Ray, B. 1993. Sublethal Injury, Bacteriocins and Food Microbiology, ASM. News, Vol. 59 No. 6
- Ray, S.K., W.J. Kim, M.C. Johnson and B. Ray. 1989. Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. J. Appl. Bacteriol, 66: 393-399
- Ray, S.K., M.C. Johnson, B. Ray. 1989. Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. Industrial Microbiol. 4:163-171
- Rodriquez, J.M., M.I. Martinez, J. Kok. 2002. Pediocin PA-1 a wide Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria, CRC Journals. Vol. 42.
- Rybicky and M. Purves. 1996. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) dalam Coyne, V.E., D.M. James, S.J. Reid and E.P. Rybicky (Ed) Molecular Biology Techniques Manual 3rd. Dept. Microbiology, Univ. of Cape Town.
- Sambrook, J.E.F. Miniatis and T. Miniatis. 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd ED. Cold Spring Harbour New York, Coal Spring Harbour Press.
- Schlegel, H.G., dan K. Schmidt. 1994. Mikrobiologi Umum. Penerjemah Baskoro, R.M.T. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe dan J.G. Holt. 1986. Bergeys manual of systematic bacteriology. Vol 2. Baltimore : Williams and Wilkins.
- Tan, J.D., F.C.F. Galvez, K. Asano, F. Tomita. 2001. Isolation and Partial Purification of Bacteriocin Produced by Microorganismus from Agos-os. Biotech.for Sustainable Utilization of Biological, Y.Morooka (Ed.) Intern.Cent.for Biotech.Osaka Univ. Osaka. Japan.
- Yang R., and B. Ray. 1994. Factor influencing production of bacteriocin by lactic acid Bacteria. Food Microbial. 11:281 – 291.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. I Gede Putu Wirawan, MSc dan Dr. Ir. Ida Bagus Oka, MS, serta rekan-rekan Ir Ni Made Darmadi, MSi., Ir. A.A. Made Semariyani, MSi., Ir. I Dewa Gd. Semara Edi, MSi., dan Ir. Agung Laksmi, MSi., yang telah membantu di Laboratorium selama penelitian ini.