

**PENENTUAN WAKTU PRODUKSI OPTIMUM BAKTERIOSIN ASAL *Lactobacillus plantarum* B1765 BERDASARKAN AKTIVITAS PENGHAMBATANNYA TERHADAP *Staphylococcus aureus***

**DETERMINATION OF OPTIMUM BACTERIOGIN PRODUCTION TIME FROM *Lactobacillus plantarum* B1765 BASED ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST *Staphylococcus aureus***

**Alfiyana Hasan and Prima Retno Wikandari\***

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences*

*State University of Surabaya*

*Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761*

\* Corresponding author, email: [primawikandari@unesa.ac.id](mailto:primawikandari@unesa.ac.id)

**Abstrak.** Tujuan penelitian ini untuk mengetahui waktu produksi optimum bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* B1765 berdasarkan aktivitas penghambatannya terhadap *Staphylococcus aureus*. Uji aktivitas dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram pada setiap fase pertumbuhan, dimana fase pertumbuhan ditentukan dengan mengukur tingkat kekeruhan suspensi bakteri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  560 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* B1765 mengalami tiga fase dalam pertumbuhannya selama 48 jam, yaitu fase lag pada jam 0-6, fase log pada jam 6-18, dan fase stasioner pada jam 18-48. Waktu produksi optimum diidentifikasi sebagai waktu bagi *Lactobacillus plantarum* B1765 dalam memproduksi senyawa antimikroba bakteriosin secara optimal, yakni ditentukan berdasarkan besarnya zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang berisi supernatan bebas sel *Lactobacillus plantarum* B1765. Produksi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* B1765 dilakukan pada waktu inkubasi 26 jam, dimana terbentuk zona bening dengan diameter terbesar sebesar 13,1375 mm. Sehingga diperoleh aktivitas penghambatan sebesar 2062,259 AU/mL.

**Kata kunci :** *Bakteriosin, Lactobacillus plantarum* B1765, *Staphylococcus aureus*

**Abstract.** The aim of this study was to determine the optimum bacteriocin production time of *Lactobacillus plantarum* B1765 based on its inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*. The activity test was done by disc diffusion method at each growth phase, wherein the growth phase was determined by measuring the turbidity of bacterial suspension using UV-Vis spectrophotometer at  $\lambda$  560 nm. The results showed that *Lactobacillus plantarum* B1765 had three phases in its growth for 48 hours, the lag phase at 0-6 hours, the log phase at 6-18 hours, and the stationary phase at 18-48 hours. The optimum production time was identified as the time for *Lactobacillus plantarum* B1765 to produce an optimal bacteriocin antimicrobial compound, determined based on the clear zone formed around the disk-paper was containing cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* B1765. Production of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* B1765 was done at incubation time 26 hours, which formed the largest clear zone at 13,1375 mm. Thus, the value of inhibition activity is 2062,259 AU/mL.

**Keywords :** *Bacteriocin, Lactobacillus plantarum* B1765, *Staphylococcus aureus*

## PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir sering timbul adanya kasus *foodborne disease* yang

disebabkan oleh makanan yang terkontaminasi bakteri patogen salah satunya yaitu *Staphylococcus aureus* [1]. Bakteri ini memproduksi enterotoksin yang dapat

menyebabkan kasus keracunan makanan akibat rendahnya tingkat sanitasi pada lingkungan. Upaya pengendalian pertumbuhan bakteri patogen tersebut ke dalam bahan pangan dapat dilakukan dengan penambahan bahan pengawet (preservatif). Namun penggunaan pengawet sintetis untuk makanan dalam jangka waktu lama dapat memicu resiko penyakit kanker karena sifatnya yang mutagenik [2]. Oleh karena itu, dewasa ini banyak dikembangkan biopreservatif sebagai upaya untuk meminimalisir penggunaan preservatif sintetis.

Bakteri asam laktat merupakan salah satu bakteri yang saat ini banyak dikembangkan menjadi biopreservatif karena dapat menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, dan diasetil [3]. Bakteri ini termasuk mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS) sehingga aman jika ditambahkan ke dalam bahan pangan [4].

Menurut Sukarya [5] bakteriosin sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan pengawet makanan karena sifatnya yang mudah terdegradasi oleh sistem pencernaan sehingga tidak berbahaya bagi kesehatan, serta dapat membunuh bakteri pembusuk dan patogen yang terdapat dalam bahan pangan. *Lactobacillus plantarum* merupakan kelompok BAL yang berpotensi memproduksi bakteriosin. Beberapa strain *Lactobacillus plantarum* diketahui dapat menghasilkan bakteriosin meliputi *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1A5, 1B1, dan 2B2 asal daging sapi [3], plantaricin EF, plantaricin W, plantaricin JK, dan plantaricin S dari *Lactobacillus plantarum spp* [6].

Bakteri asam laktat dengan strain yang berbeda dapat menghasilkan bakteriosin pada fase yang berbeda pula. Sekresi bakteriosin dapat terjadi pada saat mencapai akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner [7], terkadang adapula bakteriosin yang diproduksi pada akhir fase stasioner, dan bakteriosin lain disintesis selama fase stasioner mengikuti pola sintesis protein melalui jalur ribosomal [8].

Dalam penelitian ini bakteri yang digunakan sebagai penghasil bakteriosin adalah *Lactobacillus plantarum* B1765. *Lactobacillus plantarum* B1765 merupakan isolat bakteri asam laktat yang berasal dari bekasam [9].

Dalam Sujadmiko [10] menyebutkan bahwa bakteri ini menunjukkan sifat antagonistik dengan kriteria inhibisi kuat terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*. Namun belum dilakukan produksi senyawa yang berpotensi menghambat bakteri patogen tersebut, sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk memproduksi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* B1765 pada waktu optimum yang ditentukan berdasarkan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus*.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini meliputi: *Lactobacillus plantarum* B1765, *Staphylococcus aureus*, MRS Broth (Merck), Nutrient Broth (Oxoid), agar, aquademin (Brataco), NaOH (Merck), etanol 96% (v/v).

### Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi: gelas ukur (pyrex), erlenmeyer (pyrex), tabung sentrifus, neraca analitik, mikropipet, bluetip, cawan petri, magnetic stirer, waterbath, refrigerator, kertas cakram, jangka sorong, kawat ose, autoklaf, inkubator (memmert), sentrifus (eppendorf 5810), laminar air flow UL-US (Thermo Fisher Scientific), digital vortex mixer, dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1800).

## Prosedur Penelitian

### 1. Persiapan kultur kerja

Sebanyak 9 mL media MRS Broth steril diinokulasi 1 mL kultur stok primer *Lactobacillus plantarum* B1765, selanjutnya

diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Dishaker dengan kecepatan 1200 rpm.

## 2. Analisis kurva pertumbuhan

Sebanyak 1 mL kultur kerja *Lactobacillus plantarum* B1765 diinokulasikan ke dalam 9 mL MRS Broth steril, dikocok pada kecepatan 1200 rpm lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan setiap dua jam. 1 mL masing-masing larutan dari setiap waktu inkubasi diencerkan dengan 9 mL aquademin steril, kemudian ditentukan nilai absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  560 nm. Hubungan antara absorbansi dan waktu inkubasi dinyatakan sebagai kurva pertumbuhan.

## 3. Persiapan inokulum bakteri patogen

Sebanyak 1 mL kultur stok *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan dalam 9 mL media Nutrient Broth steril, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

## 4. Uji aktivitas terhadap bakteri patogen

Kertas cakram steril yang dibuat dari kertas saring Whatman dengan diameter  $\pm$  6 mm direndam ke dalam 50  $\mu$ L larutan uji selama 30 menit. Dalam hal ini larutan uji merupakan supernatan bebas sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi kultur kerja *Lactobacillus plantarum* B1765. Kertas cakram kemudian diletakkan secara steril di atas medium Nutrient Agar yang sebelumnya telah diinokulasi 1 mL *Staphylococcus aureus* dan dibiarkan hingga mengeras. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Aktivitas penghambatan bakteriosin dinyatakan dalam satuan *activity units* per mL (AU/mL), yang secara matematis dapat dituliskan seperti persamaan 1 [9].

$$\text{Aktivitas bakteriosin (mm}^2\text{/mL)} = \frac{Lz-Lc}{V} \dots (1)$$

Keterangan: Lz = Luas zona bening (mm<sup>2</sup>)

Lc = Luas kertas cakram (mm<sup>2</sup>)

V = Volume contoh (mL)

## 5. Produksi Bakteriosin

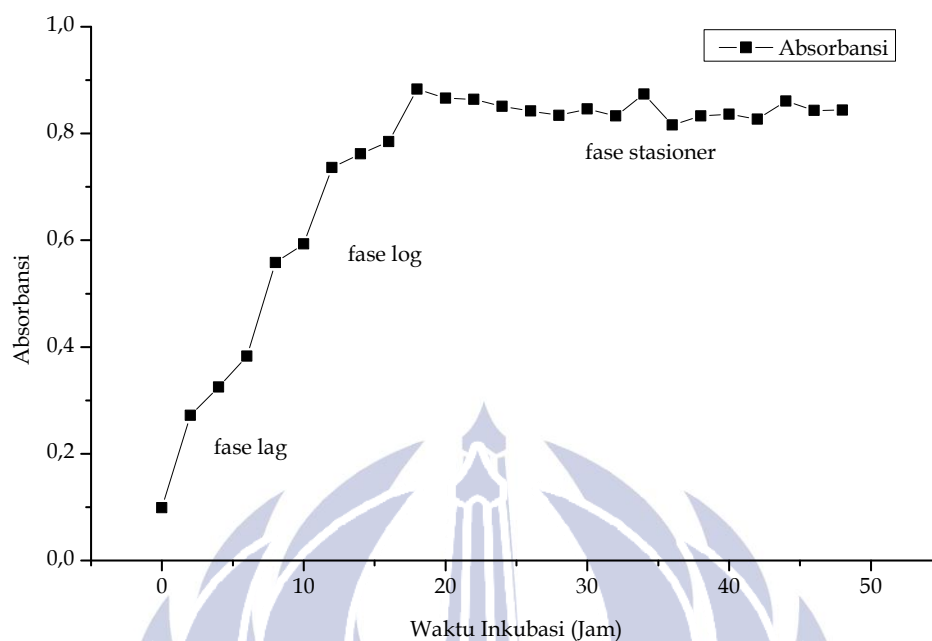
Media MRS broth steril diinokulasi dengan 10% (v/v) kultur *Lactobacillus plantarum* B1765 selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu optimum (hasil analisis kurva pertumbuhan). Media hasil inkubasi disimpan dalam refrigerator dengan suhu 4°C selama 2 jam. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 4500 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C untuk memperoleh supernatan bebas sel. Proses sentrifugasi menghasilkan cairan dua fase yaitu supernatan dan endapan. Supernatan kemudian dipisahkan dengan cara didekantasi, dan kemudian dinetralkan pH nya menjadi pH 7,0 dengan NaOH 1M.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* B1765

Tahap ini ditentukan berdasarkan tingkat kekeruhan suspensi isolat *Lactobacillus plantarum* B1765 dalam media MRS Broth selama 48 jam dengan pengamatan setiap dua jam menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-1800) pada  $\lambda$  560 nm. Kekeruhan larutan sampel menunjukkan banyaknya sel yang tumbuh. Hal ini dikarenakan sampel sel mikroba dengan tingkat kekeruhan tertentu akan menentukan jumlah cahaya yang diserap (terabsorpsi) yang dibaca dalam bentuk absorbansi. Semakin keruh suspensi bakteri maka semakin banyak jumlah sel yang tumbuh ditandai dengan meningkatnya nilai absorbansi yang dihasilkan. Hasil nilai absorbansi dari suspensi *Lactobacillus plantarum* B1765 disajikan pada gambar 1.





**Gambar 1.** Kurva Pertumbuhan Isolat *Lactobacillus plantarum* B1765

Berdasarkan gambar 1 menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* B1765 mengalami tiga fase dalam pertumbuhannya selama 48 jam. Pada awal pertumbuhan yakni jam ke 0 hingga jam ke 6, *Lactobacillus plantarum* B1765 mengalami fase lag. Menurut Fardiaz [11], lamanya fase adaptasi ditentukan oleh beberapa faktor salah satunya yaitu kondisi media kultivasi yang digunakan. Pada penelitian Panggayuh [12], *Lactobacillus plantarum* B1765 ditumbuhkan dalam media MRS Broth yang diperkaya kasein menunjukkan fase lag yang lebih lama yaitu pada jam ke-0 hingga jam ke-8. Penambahan kasein akan menyebabkan kemampuan bakteri dalam beradaptasi dengan lingkungan cenderung lebih lambat karena enzim protease dalam sel bakteri akan mengkatalisis degradasi kasein menjadi asam amino.

Setelah beradaptasi dengan lingkungannya, bakteri akan mengalami peningkatan jumlah sel yang berlangsung cepat dalam fase log (eksponensial). Pada fase log semua sel membelah diri secara teratur melalui pembelahan biner, dan tumbuh dengan deret sehingga massa sel menjadi dua kali lipat lebih banyak, serta akan dihasilkannya metabolit

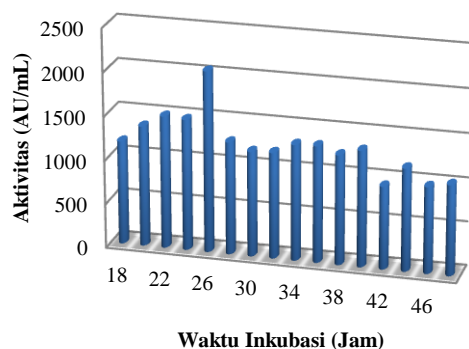
primer. Dalam penelitian ini *Lactobacillus plantarum* B1765 memasuki fase log pada waktu inkubasi ke 6 dan mencapai pertumbuhan tertinggi pada jam ke-18.

Sedangkan pada jam ke-18 hingga jam ke-48 *Lactobacillus plantarum* B1765 telah mengalami fase stasioner. Pada fase ini terjadi keadaan seimbang antara laju pertumbuhan dengan kematian, karena cadangan makanan (nutrisi) sudah mulai menipis dan pada fase ini BAL akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan diri terhadap lingkungannya dan mikroorganisme lain, salah satunya yaitu bakteriosin [8].

## 2. Aktivitas Penghambatan Bakteriosin Terhadap *Staphylococcus aureus*

Uji aktivitas bakteriosin dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram (*Disc Diffusion Method*) selama fase stasioner yang diperoleh dari analisis kurva pertumbuhan yakni 18-48 jam. Hal ini dikarenakan fase stasioner merupakan fase yang optimal bagi BAL dalam memproduksi senyawa antimikroba seperti bakteriosin [3]. Hasil pengamatan yang diperoleh adalah terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram setelah masa inkubasi.

Hasil uji aktivitas bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Aktivitas Bakteriosin Terhadap *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 2 menunjukkan bahwa pada awal fase stasioner, bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* B1765 memiliki aktivitas yang rendah kemudian membentuk pola yang cenderung naik hingga mencapai titik optimum. Aktivitas bakteriosin mencapai optimum pada jam ke-26 dengan aktivitas sebesar 2062,259 AU/mL dan rerata diameter zona bening sebesar 13,725 mm (Gambar 3). Dengan bertambahnya waktu inkubasi, aktivitas bakteriosin menunjukkan hasil yang cenderung menurun hingga akhir fase stasioner. Hal ini dikarenakan waktu inkubasi berhubungan dengan nutrisi, pH media dan suhu yang merupakan faktor kritis suatu bakteri dalam menghasilkan bakteriosin. Meningkatnya waktu inkubasi akan menyebabkan nutrisi dalam media menjadi menipis dan pH menjadi sangat asam karena terjadi produksi asam-asam organik dalam jumlah besar, sehingga aktivitas bakteriosin menjadi cenderung menurun.



**Gambar 3.** Zona bening yang terbentuk pada waktu inkubasi jam ke-26

Pada gambar 3 menunjukkan bahwa diameter antimikroba yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* B1765 dapat dikategorikan kuat [13]. Zona bening tersebut terjadi karena adanya pembentukan cincin-cincin hambatan pada pertumbuhan bakteri di dalam media padat oleh zat antimikroba. Semakin luas zona bening maka semakin kuat daya hambat suatu antimikroba.

Produksi antimikroba bakteriosin dilakukan dengan menetralkan pH supernatan bebas sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi media. Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C dengan tujuan agar protein antimikroba tidak rusak. Proses penetralan diperlukan dikarenakan dalam keadaan asam *Lactobacillus plantarum* B1765 menghasilkan asam-asam organik diantaranya asam laktat, asam propionat, asam butirat, dan asam asetat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan wilayah penghambatan terbesar daripada jenis bakteri asam laktat lain.

Dalam Rafsanjani dan Wikandari [14] menyebutkan pula bahwa piket umbi yakon yang difermentasi *Lactobacillus plantarum* B1765 menurun dari pH awal 6,15 hingga mencapai 3,28 pada lama fermentasi 48 jam. Oleh karena itu, penetralan dilakukan bertujuan agar asam-asam organik yang terdapat pada supernatan dalam keadaan netral, sehingga aktivitas antimikroba yang diperoleh dapat dipastikan berasal dari senyawa bakteriosin.

Mekanisme kerja bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain pada

umumnya dengan menyerang membran sitoplasma sel bakteri target. Molekul bakteriosin yang bermuatan positif akan berinteraksi secara elektrostatis dengan gugus fosfat yang bermuatan negatif pada membran sel target, sehingga akan menyebabkan terbentuknya pori pada membran yang akhirnya menyebabkan sel mengalami lisis.

#### KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah waktu inkubasi optimum untuk produksi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* B1765 terjadi pada fase stasioner yakni jam ke-26 dengan aktivitas maksimum sebesar 2062,259 AU/mL terhadap *Staphylococcus aureus* dengan rerata diameter zona hambat sebesar 13,725 mm.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Scallan, E., *et al.* 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*.
2. Oms-Oliu, G., *et al.* 2010. Recent Approaches Using Chemical Treatment to Preserve Quality of Fresh-Cut Fruit; A Review. *Postharvest Biology and Technology*. 139-148.
3. Jati, A. U. 2012. Produksi Bakteriosin Kasar *Lactobacillus plantarum* 2C12, 1A15, 1B1, dan 2B2 Asal Daging Sapi Serta Aktivitas Antimikrobanya Terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Peternakan IPB.
4. Kusmiati, dan Malik, A. 2002. Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbacl Pada Berbagai Media. *Makara Kesehatan*. Vol. 6, No. 1.
5. Sukarya, R. 2009. Aplikasi Bakteriosin dari *Lactobacillus* sp Galur SCG 1223 Sebagai Pengawet Daging Ayam Segar. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
6. Zacharof, M., dan Lovitt, a. R. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia*. 50-56.
7. Jimenez-Diaz. 1993. Plantaricin S and Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 Isolated from A Green Olive Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416-1429.
8. Fawzya, Yusro Nuri. 2010. Bahan Pengawet Nisin: Aplikasinya pada Produk Perikanan. *Squalen*. Vol. 5, No. 3.
9. Wikandari, Prima Retno. 2011. Potensi Bakteri Asam Laktat Indigenus Sebagai Penghasil Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Pada Fermentasi Bekasam. *Disertasi* tidak dipublikasikan. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
10. Sujadmiko, Wijo K.K.Y. 2016. Uji Potensi Probiotik Strain *Lactobacillus plantarum* B1765 Secara In Vitro. *Skripsi*. Surabaya: UNESA.
11. Fardiaz. 1989. Mikrobiologi Pangan. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Bogor.
12. Panggayuh, Diah P. 2014. Pengaruh Konsentrasi Ammonium Sulfat Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler *Lactobacillus Plantarum* B1765 Isolat Bekasam. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya
13. Wewengkang, Defny S., dkk. 2014. Karakterisasi dan Bioaktif Antibakteri Senyawa Spons *Haliclona* sp. Dari Teluk Manado. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. Vol. 1, No. 1.
14. Rafsanjani, Ega Rocky dan Wikandari, Prima Retno. 2017. Pengaruh Lama Fermentasi Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* B1765 terhadap Mutu Pikel Umbi Yakon (*Smallanthus sonchifolius*). *UNESA Journal of Chemistry*, Vol.6, No.2.