

LAPORAN HASIL PENELITIAN

Purifikasi dan Karakterisasi Bakteriosin dari Rakteri Asam Laktat (BAL)



Ketua Peneliti:

Dr. AGUSTIN KRISNA WARDANI, STP, MSi

**Penelitian ini dibiayai oleh PNBP FTP 2008
Dengan No. Kontrak: 853A/J10.1.26/PG/2008**

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya
Malang
2008**

HALAMAN PENCESAHAN HASIL PENELITIAN OPF


1. a. Judul Penelitian : Purifikasi dan Karakterisasi Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat (BAL)
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama lengkap dan gelar . Dr. Agustin Krisna Wardani, STP, MSi.
 - b. Jenis Kelamin Perempuan
 - c. Gol. Pangkat dan NIP . III-a/Asisten Ahli/ 132158728
 - d. Jabatan Fungsional Dosen
 - e. Jabatan Struktural -
 - f. Fakultas/Jurusan Teknologi Pertanian/Teknologi Hasil Pertanian
3. Jumlah tim peneliti Tiga (3) orang
 - a. Nama anggota peneliti . 1. Wenny Bektu Sunarharum, STP, M.Food.St.
2. Indria Purwantiningrum, STP., MSi.
3. Novita Wijayanti, STP
4. Lokasi penelitian Laboratorium Mikrobiologi
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
5. Lama Penelitian : 4 bulan
6. Sumber Dana : PNBP Fak. Teknologi Pertanian
7. Riaya yang dibutuhkan . Rp. 3.500.000,- (tiga juta lima ratus ribu rupiah)

Menyctujui,
Ketua Badan Pertimbangan Penelitian
Fak. Teknologi Pertanian


Dr. Ir. H. Bambang Dwi Argo, DEA
NIP. 131 574 385

Malang, 14 November 2008
Ketua Peneliti,


Dr. Agustin Krisna Wardani, STP, MSi
NIP. 132 158 728

Mengetahui,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Brawijaya Malang,

Prof. Dr. Ir. H. Harijono, M.App.Sc.

NIP. 130 809 058

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	1
I. PENDAHULUAN	2
1.1 Latar Belakang.....	2
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Manfaat	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat	3
2.2 Purifikasi Bakteriosin	9
2.3 Metode Uji Aktifitas Bakteriosin	13
2.4 Aplikasi Bakteriosin	14
III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.3 Pelaksanaan Penelitian	17
3.4 Analisis Penelitian	17
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Skrining BAL Secara Kualitatif	22
4.2 Skrining BAL Secara Kuantitatif	24
4.3 Ekstraksi Bakteriosin dari Isolat BR-8	26
4.4 Deteksi Bakteriosin dari Isolat BR-8 dengan SDS-PAGE	29
4.5 Purifikasi Bakteriosin dari Isolat BR-8	30
4.6 Karakterisasi Bakteriosin dari Isolat BR-8.....	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39

II. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini kecenderungan konsumen untuk mengonsumsi bahan pangan yang bersifat segar, alami, sehat dan bebas bahan pengawet semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena meningkatnya kesadaran konsumen terhadap keamanan bahan pangan. Bahan pangan yang diawetkan dengan suhu dingin (*refrigerated food*) merupakan bahan pangan yang bersifat lebih alami serta lebih segar bila dibandingkan dengan bahan pangan awetan lainnya yang memanfaatkan bahan kimia sebagai bahan pengawet. Namun demikian kenyataan menunjukkan bahwa pengawetan dengan suhu dingin belum mampu mencegah tumbuhnya beberapa bakteri patogen, hal ini dibuktikan dengan masih ditemukannya beberapa bakteri patogen psikotropik dalam bahan pangan tersebut misalnya *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* B dan E, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* dan beberapa enterotoksigenik *Escherichiu coli*.

Listeria monocytogenes merupakan bakteri Gram positif, fakultatif anaerob yang saat ini merupakan bakteri patogen yang banyak ditemukan dalam bahan pangan khususnya bahan pangan yang disimpan dingin. Dampak negatif kesehatan dapat ditimbulkan oleh *Listeria monocytogenes* terutama bagi wanita hamil, bayi yang baru lahir dan balita. Beberapa sifat yang dimiliki oleh *Listeria monocytogenes* adalah kemampuan untuk tumbuh pada beberapa kondisi lingkungan seperti suhu dingin maupun suhu tinggi (1 – 45^o C), pH rendah, serta pada konsentrasi garam tinggi (lebih 10) sehingga menyebabkan *Listeria monocytogenes* sulit untuk dikendalikan. Tumbuhnya bakteri patogen psikotropik *Listeria monocytogenes* atau bakteri patogen lainnya dalam bahan pangan yang disimpan pada suhu dingin ini merupakan masalah yang harus segera diatasi. Bahan pengawet yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut, namun masih dapat mempertahankan sifat alami, kesegaran dan keamanan bahan pangan yang diawetkan sangatlah diperlukan.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan jenis bakteri yang telah lama dikenal mampu memperpanjang masa simpan bahan pangan, karena kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antibakteri seperti asam laktat, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin. Penambahan bakteri asam laktat spesies *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* dan *Pediococcus* spp. dalam jumlah tinggi dapat mengendalikan bakteri pembusuk

dan bakteri patogen dalam bahan pangan seperti produk daging, susu dan keju selama pendinginan pada suhu dibawah 5^o C. Selain itu bakteri asam laktat tersebut juga mampu mengendalikan pertumbuhan beberapa bakteri pembusuk dan bakteri patogen ada suhu lebih tinggi (10-12^o C). Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan senyawa antibakteri menjadikan bakteri asam laktat berpotensi digunakan sebagai bahan pengawet alami pada bahan pangan. Bakteriosin adalah salah satu senyawa antibakteri yang dihasilkan bakteri asam laktat yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan pengawet alami karena kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain.

Nisin merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* yang sudah sejak lama digunakan di beberapa negara sebagai pengawet hahan pangan. Sejak tahun 1969 nisin telah dinyatakan sebagai bahan pengawet pangan oleh Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Dan pada tahun 1988 nisin telah dikategorikan ke dalam *generally recognized as safe* (GRAS) sebagai *food ingredient* bahan pangan.

Pada penelitian ini digunakan isolat BK-8, bakteri asam laktat yang diisolasi dari produk daging. Isolat ini dihipotesiskan dapat menghasilkan bakteriosin yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengawet alami bahan pangan. Pemilihan isolat BR-8 sebagai bakteri penghasil bakteriosin didasarkan atas skrining yang telah dilakukan pada awal penelitian. Skrining ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dengan aktivitas tertinggi dalam menghambat bakteri lain. Langkah selanjutnya adalah melakukan purifikasi dan karakterisasi terhadap bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BR-8.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat BAL penghasil bakteriosin dengan kemampuan penghambatan tertinggi terhadap bakteri lain serta melakukan purifikasi dan karakterisasi bakteriosin yang dihasilkan.

1.3 Manfaat

Memanfaatkan bakteriosin sebagai bahan pengawet alami yang aman pada produk makanan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat atau batang, memproduksi asam laktat sebagai produk akhir selama fermentasi karbohidrat, katalase negatif, mikroaerotoleran dan asidotoleran. Bakteri asam laktat seringkali tumbuh pada habitat kaya nutrisi seperti susu, daging dan sayuran namun sebagian bakteri asam laktat juga dapat ditemukan dalam usus, mulut dan vagina mamalia. Klasifikasi BAL pada tingkat genera didasarkan pada morfologi, model fermentasi gula, suhu pertumbuhan, kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam tinggi dan toleransi pada kondisi asam atau basa. Beberapa genera BAL meliputi *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Carnobacterium* spp., *Vagococcus* spp. dan *Tetragenococcus* spp. Metabolisme bakteri asam laktat dapat digunakan untuk mengelompokkan BAL sebagai homofermentatif atau heterofermentatif. Kelompok homofermentatif yaitu spesies BAL yang merubah glukosa menjadi asam laktat melalui jalur *Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP). Kelompok kedua adalah kelompok heterofermentatif yaitu spesies BAL yang menghasilkan campuran produk fermentasi asam laktat dan produk lainnya yaitu etanol asam asetat dan gas CO₂ melalui jalur fermentasi 6-fosfoglukonat/fosfoketolase (6-PG/PK) (Axelsson, 1993). Gambar 1 menunjukkan jalur fermentasi glukosa oleh bakteri asam laktat yaitu jalur *Embden-Meyehoff-Parnas* (EMP) dan jalur 6-phosphoglukonat/phosphoketolase (6-PG/PK). Pada tingkat spesies klasifikasi BAL didasarkan pada isomer asam laktat (D, L atau DL) yang dihasilkan, tipe asam diamino pimelat dalam peptidoglikan (DAP atau non DAP), pembentukan dekstran dari sukrosa, hidrolisis arginin serta kemampuan menghasilkan asam dari berbagai sumber karbon (Rahayu dan Margino, 1997)

Bakteri asam laktat telah banyak digunakan dalam fermentasi susu, daging dan sayuran (Jaminez-Diaz *et al*, 1995). *Lactobacillus plantarum pentosus* kompleks merupakan BAL yang banyak ditemukan pada berbagai makanan hasil fermentasi asli Indonesia misalnya asinan terong, gatot, tempe, tape, tempoyak, asinan rebung, growol dan moromi. Bahkan dari berbagai isolat ini diantaranya *Lactobacillus plantarum* TGR-

2 yang diisolasi dari growol mampu menghasilkan senyawa antibakteri mirip bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* (Rahayu *et al.*, 1996).

Kemampuan BAL dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain menjadikan BAL sangat berpotensi sebagai biopreservasi pada bahan pangan. Penghambatan ini disebabkan oleh beberapa komponen antibakteri seperti asam organik (asam laktat, asam asetat, asam propionat), H₂O₂, diasetil dan bakteriosin. Beberapa penelitian melaporkan bahwa BAL mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri pembusuk pada bahan pangan. Daty *et al.* dalam Ray (1992) melaporkan bahwa *Streptococcus diacetylactis* strain 18-16 mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dan *Serratia marcescens* sebesar 99,9 selama 24 jam. Lebih lanjut Tanaka *et al.* dalam Ray (1992) melaporkan bahwa selama fermentasi daging; *Lactobacillus plantarum* mampu menghambat pertumbuhan *Clostridium botulinum* sebesar 95 karena aktivitas asam yang dihasilkannya. Penggunaan strain penghasil bakteriosin seperti *Lactobacillus sake* atau *Pediococcus* sp. selama fermentasi saus efektif dalam menurunkan pertumbuhan *Listeria monocytogenes* (Juntilla *et al.* dalam Ray (1992)). Penghambatan pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri pembusuk pada fermentasi susu oleh BAL telah banyak dilaporkan. Misalnya *Streptococcus* spp. mampu menghambat sebesar 86-99 pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium* selama 6 jam pada suhu 32° C. Lebih lanjut dinyatakan bahwa *Lactobacillus bulgaricus* mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas fragi* pada susu selama 24 jam (Gilliland and Speck dalam Ray 1992).

Kekerabatannya serta memiliki spektrum penghambatan sempit. Definisi bakteriosin berkembang sampai pada tahun 1982 seperti yang dikemukakan oleh Konisky bahwa hanya ada dua persyaratan unik bakteriosin yaitu bakteriosin merupakan protein dan tidak bersifat memalikan terhadap sel yang memproduksinya (*not suicide proteins*) (Jack *et al.*, 1995).

Klaenhammer (1988) mengemukakan beberapa sifat bakteriosin yaitu pada umumnya stabil terhadap panas, sensitif terhadap beberapa enzim proteolitik, bakterisidal terhadap bakteri lain dan memiliki spektrum penghambatan sempit. Bakteriosin efektif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, namun pada umumnya efektif terhadap bakteri Gram positif.

Berdasarkan sifat biokimia dan studi genetik, Klaenhammer (1994) membagi bakteriosin menjadi 4 kelas. Kelas I merupakan bakteriosin lantibiotik yang mengandung asam amino lantionin dan β -meallantionin (*unusual amino acids*) yang terbentuk melalui modifikasi pasca translasi asam amino karena terjadi proses dehidrasi pada asam amino serta terbentuknya ikatan thioeter. Kelas II merupakan kelompok bakteriosin yang merupakan molekul kecil (< 10 kDa), tahan panas serta non lantibiotik (tidak mengandung *unusual amino acids*). Kelas III merupakan kelompok bakteriosin dengan molekul besar (> 30 kDa) dan sensitif terhadap panas sedangkan kelas IV adalah kompleks bakteriosin yang mengandung karbohidrat atau lemak.

Bakteriosin dapat dihasilkan oleh berbagai spesies bakteri asam laktat maupun bakteri lain selain bakteri asam laktat. Namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa pada umumnya bakteri asam laktat lebih banyak digunakan sebagai penghasil bakteriosin dibandingkan bakteri lain, hal ini disebabkan karena bakteri asam laktat telah terbukti sebagai bakteri yang aman dan telah lama terlibat dalam proses fermentasi bahan pangan. Beberapa bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL misalnya bacteriocin S50, dan lactacin 3147 merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactococcus* spp.. Camocin U149 merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Carnobacterium* spp., sedangkan lactacin B dan plantaricin C19 dihasilkan oleh *Lactobacillus* spp.. Bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies *Leuconostoc* misalnya leucocin A dan mesenterocin 5 sedangkan dari *Pediococcus* spp. dapat dihasilkan pediocin PA-I. Pada Tabel 1 disajikan beberapa jenis bakteriosin yang dihasilkan oleh berbagai spesies BAL.

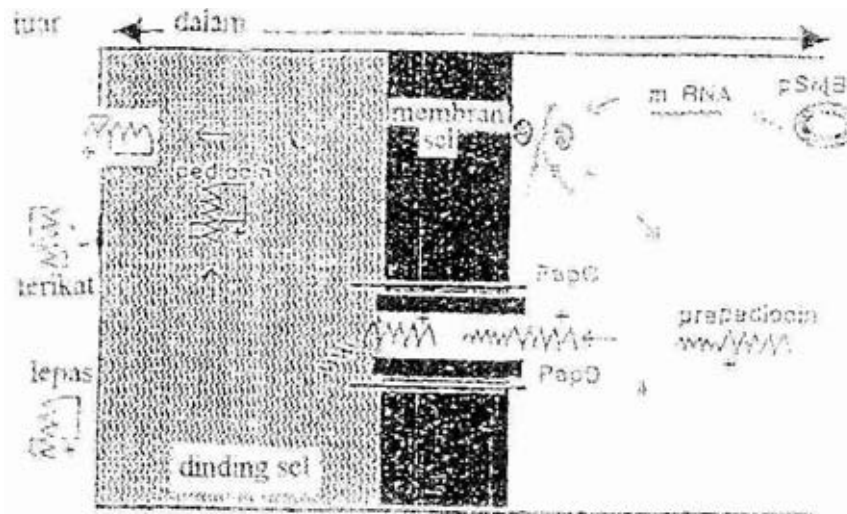
Tabel 1. Beberapa macam bakteriosin dan bakteri penghasilnya

No	Bakteriosin	Bakteri penghasil	Referensi
1	Mcsenterocin 5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Daba <i>et al.</i> , 1991
2	Leucocin A	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Marco J.van Belkum dan Stiles, M.E., 1995
3	Carnocin U149	<i>Carnobacterium sp.</i>	Stoffels <i>et al.</i> , 1992
4	Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici . H</i>	Motlagh <i>et al.</i> , 1992
5	Streptococcin A-FF22	<i>Streptococcus pyrogenes</i>	Hynes <i>et al.</i> , 1993
6	Plantaricin C19	<i>LactoBacillus plantarum</i> C19	Atrih <i>et al.</i> , 1993
7	Gassericin A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	Kawai <i>et al.</i> , 1994
8	Planticin 154	<i>Lactobacillus plantarum</i> LTF154	Kanatani, K. dan Oshnnura, M., 1994
9	LactocinS	<i>Lactobacillus sake</i> LA5	Mortvedtefa/, 1995
10	Acidocin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Kanatani <i>et al.</i> , 1995
11	Bacteriocin S50	<i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> S50	Kojic <i>et al.</i> , 1991
12	Diplococcin DR	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ADRIA 85L030	Ryan <i>et al.</i> , 1996
13	Lactacin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	Auliffe <i>et al.</i> , 1998
14	Linocin MI 8	<i>Brevibacterium linens</i> MI 8	Valdes-Stauber dan Scherer, S., 1996

Bacteriocin S50, yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* S50 (Kojic *et al.*, 1991) merupakan bakteriosin yang memiliki spektrum antibakten terbatas (*narrow antibacterial spectrum*) yaitu hanya aktif terhadap spesies *Lactococcus*. Aktivitas bakteriosin S50 hilang dengan adanya perlakuan protease, namun tetap aktif dengan perlakuan pemanasan 100° C selama 60 menit, demikian juga dengan pengaruh pH 2-11, bakteriosin S50 tetap menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Sebaliknya

baktenosin yang dihasilkan *Lactococcus lactis* DPC3147 yaitu lacticin 3147 memiliki spektrum antibakteri luas (*broad antibacterial spectrum*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain tidak hanya terhadap *Lactococcus* spp. namun aktif juga terhadap spesies lain yang diujikan seperti *lactobacilli enterococci*, *leuconococci*, *pediococci*, *clostridia*, *Listeria*, *staphylococci* dan *streptococci* Auliffe *et al.* (1998) menyatakan bahwa lacticin 3147 bersifat bakterisidal terhadap *L. lactis*, *Listeria monocytogenes* dan *Bacillus subtilis*. Bakteriosin ini stabil terhadap panas yaitu tetap memiliki aktivitas antibakteri meskipun dengan perlakuan pemanasan 60, 70, 80, 90, 100 dan 121^o C selama 10 menit. Lacticin 3147 tetap menunjukkan aktivitas antibakteri pada pH 5, 7 dan 9. Namun dengan perlakuan enzim proteinase K, lacticin 3147 kehilangan aktivitas antibakterinya (Ryan *et al.*, 1996). Bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies *Camobacterium* yaitu carnocin U149 diketahui memiliki stabilitas terhadap pengaruh panas serta perlakuan pH 2-8 dan aktivitas hilang dengan perlakuan di atas pH 8. Analisis asam amino menunjukkan bahwa camocin U149 tergolong sebagai lantibiotik dan memiliki 35-37 asam amino. Berat molekul yang dimiliki berkisar antara 4,5-5,0 kDa (Stoffels *et al.*, 1992). Lactacin B adalah salah satu bakteriosin yang dihasilkan oleh *LactoBacillus* spp. Bakteriosin ini stabil terhadap pemanasan, memiliki spektrum penghambatan sempit, serta memiliki berat molekul 28 kDa (Barefoot *et al.*, 1994). Selain itu, plantaricin C19 juga merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies *LactoBacillus* hasil isolasi dari makanan fermentasi (*fermented cucumbers*) yang diketahui memiliki karakter stabil terhadap asam, panas, mempunyai berat molekul 3.5 kDa, serta mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen seperti *Listeria* spp. dan *Bacillus coagulans* serta bakteri pembusuk (Atnhetal., 1993).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies *Leuconostoc* misalnya *L. gelidum* yang diisolasi dari daging, dikenal sebagai leucocin A (Hasting and Stiles, 1991). Mesenterocin 5 dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* UL5, merupakan bakteriosin yang diisolasi dari keju. Bakteriosin ini memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes*, stabil terhadap pengaruh panas (100^o C, 30 menit) dan memiliki berat molekul 4,5 kDa (Daba *et al.*, 1991)



Gambar 2. Hipotesis model Mosintesis pediocin AcH (Bukhtiyarova *et al.*, 1994)

Bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies *Pediococcus* misalnya pediocin PA-1 memiliki karakter yaitu sensitif terhadap protease, papain, pepsin serta α -chymotrypsin dan memiliki berat molekul 16,5 kDa. Bakteriosin ini tetap stabil terhadap pengaruh panas (100° C, 10 menit), lipase, lizosim serta perlakuan pH 4 - 3 (Gonzales and Kunka, 1987).

Biosintesis bakteriosin secara pasti belum diketahui namun terdapat dugaan model biosintesis pediocin AcH (Gambar 2) yaitu diawali dengan transkripsi mRNA dari gen pap dalam pSMB74 selanjutnya ditranslasi sebagai prepediocin dan ditranslokasi melalui membran sitoplasma. Protein Pap C dan Pap D berfungsi membantu terjadinya translokasi prepediocin. Pediocin yang terbentuk diluar membran sitoplasma selanjutnya dikeluarkan melalui dinding sel. Pediocin yang telah keluar akan terikat pada dinding sel atau berada dalam keadaan bebas tidak terikat dinding sel, hal ini tergantung pada pH lingkungan (Bukhtiyarova *et al.*, 1994).

2.2 Purifikasi Bakteriosin

Beberapa teknik dengan berbagai kombinasi telah digunakan untuk mendapatkan bakteriosin baik dalam keadaan murni. Pada Tabel 2 disajikan beberapa metode purifikasi

bakteriosin. Pada umumnya metode purifikasi bakteriosin merupakan metode yang kompleks yang melibatkan beberapa tahapan yaitu presipitasi ammonium sulfat, kromatografi seperti *gel filtration*, *ion exchange*, *reverse phase* dan *high performance Liquid chromatography* (HPLC) (Muriana and Luchansky, 1993)

Tabel 2. Purifikasi bakteriosin dari bakteri asam laktat

Bakteri Produser	Bakteriosin	Purifikasi	Referensi
<i>Streptococcus cremoris</i> 346	diplococcin	presipitasi amonium sulfat, <i>ion-exchange chromatography</i>	Davey dan Richardson, 1981
<i>Camobacterium</i> sp.	camocin U149	presipitasi amonium sulfat, <i>cation exchange</i> , <i>hydrophobic</i> , <i>reverse-phase chromatography</i>	Stoffels <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	bulgarican	presipitasi etanol, <i>reverse-phase HPLC</i>	Abdel-Bar <i>et al.</i> , 1987
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	lactacinB	<i>ion-exchange chromatography</i> , ultrafiltrasi, gel filtrasi	Barefoot dan Klaenhammer, 1984
<i>Lactobacillus sake</i> L45	lactocin S	presipitasi amonium sulfat, anion <i>exchange</i> , <i>cation exchange</i> , <i>reverse-phase chromatography</i> , gel filtrasi	Mortvedt <i>et al.</i> , 1991
<i>Lactobacillus plantarum</i> LPCO 10	plantaricinS	presipitasi amonium sulfat, <i>reverse-phase chromatography</i>	Jimenez-Diaz <i>et al.</i> , 1995
<i>Pediococcus acidilactici</i>	pediocin AcH	presipitasi amonhmi sulfat, gel filtrasi, <i>anion exchange chromatography</i>	Bhunia <i>et al.</i> , 1988
<i>Pediococcus acidilactici</i> UL5	pediocin PA-1	ekstraksi (adsorbsi-desorbsi), HPLC	Daba <i>et al.</i> , 1994
<i>Pediococcus acidilactici</i> M	pediocin AcM	ekstraksi (adsorbsi-desorbsi), HPLC	Elegado <i>et al.</i> , 1997



Purifikasi bakteriosin pada umumnya melibatkan beberapa tahapan yaitu :

1. Presipitasi

Presipitasi digunakan sebagai tahap awal fraksinasi bakteriosin yaitu merupakan teknik pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan. Pada umumnya teknik presipitasi menggunakan ammonium sulfat, prinsip presipitasi adalah pengendapan protein karena terikatnya molekul air oleh ion garam. Molekul air akan berkurang dan bagian hidropobik protein akan saling bergabung membentuk agregat (Muriana and Luchansky, 1993). Metode ini menguntungkan karena mudah dan efektif dilakukan namun memiliki kekurangan yaitu memungkinkan ikut terendapnya protein dan molekul lain seperti glikogen, pati, atau polisakarida (Sasha and Seifler, 1990).

2. Metode adsorpsi-desorpsi

Kelemahan pemurnian bakteriosin dengan teknik presipitasi ammonium sulfat dapat teratasi dengan adanya teknik purifikasi baru yang melibatkan teknik adsorpsi dan desorpsi bakteriosin pada dinding sel bakteri dengan menggunakan pH tertentu (Bhunja, 1991). Teknik purifikasi terbaru yang didasarkan pada prinsip adsorpsi-desorpsi telah dibuktikan berhasil mendapatkan ekstrak bakteriosin dalam keadaan murni (Yang *et al.*, 1992). Selanjutnya Yang *et al.* (1992) mengemukakan bahwa molekul bakteriosin akan teradsorpsi sebesar 93-100 pada pH sekitar 6,0 dan adsorpsi terendah sampai 5 dicapai pada pH 1,5-2,0. Ekstraksi nisin dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dilakukan pada pH 6,5 untuk proses adsorpsi dan proses desorpsi dilakukan pada pH 2,5 ternyata mampu menghasilkan ekstrak sebesar 93.3 (Yang *et al.*, 1992). Daba *et al.* (1994) menyebutkan bahwa pemurnian bakteriosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* UL5 berhasil dilakukan dengan tahapan ekstraksi pada kondisi asam yang menggunakan pH 2 dan dilanjutkan dengan *reversed*- phase HPLC. Metode ini juga berhasil dilakukan terhadap pediocin AcM yaitu bakteriosin yang dihasilkan *Pediococcus acidilactici* M dan didapatkan kemurnian bakteriosin sampai 40,4% (Elegado *et al.*, 1997).

Metode pemurnian dengan melibatkan proses adsorpsi-desorpsi memiliki beberapa keuntungan yaitu lebih mudah dilakukan karena hanya melibatkan sedikit tahapan pemurnian dan didapatkan hasil kemurnian yang cukup tinggi (Yang *et al.*, 1992; Elegado *et al.*, 1997).

3. Kromatografi Kolom

Beberapa teknik kromatografi banyak digunakan untuk melakukan purifikasi bakteriosin. Misalnya metode kromatografi gel filtrasi yaitu metode pemisahan protein yang didasarkan pada perbedaan ukuran molekul protein. Teknik ini menguntungkan karena proses pemisahan pada kolom tidak terpengaruh adanya ion-ion, deterjen, urea serta dapat diaplikasikan pada kadar ionik rendah maupun tinggi, namun kelemahan teknik ini adalah kemampuan pemisahan rendah sehingga seringkali gel filtrasi digunakan pada tahap akhir pemurnian (Stellwagen, 1990). Sedangkan kromatografi penukar ion merupakan pemisahan protein yang didasarkan pada muatan ion yang dimiliki oleh molekul protein. Teknik ini memiliki kemampuan pemisahan yang tinggi sehingga molekul dengan perbedaan muatan yang sangat kecilpun dapat dipisahkan (Rossomando, 1990).

Purifikasi dengan kromatografi penukar ion dilakukan lewat kolom yang diisi dengan matrik kation atau anion. Matrik anion mengandung *aminoethyl* (AE), *diethylaminoethyl* (DEAE) atau *quaternary aminoethyl* (QAE) yang memiliki gugus bermuatan positif, akan mengikat senyawa bermuatan negatif. Sebaliknya matrik kation mengandung *carboxymethyl* (CM) atau *carboxymethyl* (SP) yang bermuatan negatif, akan menarik senyawa bermuatan positif (Anonim, 1983).

Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan teknik kromatografi penukar ion adalah pemilihan matrik, kestabilan protein terhadap pH dan kekuatan ionik. Pemilihan matrik, pH serta kekuatan ionik yang tepat dapat diketahui bila titik isoelektrik suatu protein telah diketahui (Harris and Angal, 1990). Teknik kromatografi lain yaitu *reverse-phase chromatography* dan *high performance liquid chromatography* (HPLC). *Reverse-phase chromatography* merupakan teknik pemisahan protein yang didasarkan adanya interaksi sifat hidrofobisitas antara protein dan matrik pada kolom sedangkan HPLC adalah teknik pemisahan protein terbaru dengan kemampuan adsorpsi-desorpsi matrik lebih tinggi, kolom dapat diaplikasikan dengan kecepatan 10-60 kali lebih tinggi serta matrik memiliki kekuatan mekanik yang lebih tinggi (Roman and Regnier, 1990).

2.3 Metode Uji Aktifitas Bakteriosin

Ada beberapa metode yang digunakan dalam melakukan skrining bakteri penghasil bakteriosin. Namun pada dasarnya ada dua macam metode yang digunakan untuk melakukan skrining yaitu metode difusi agar (*agar diffusion techniques*) dan metode pengenceran (*critical dilution method*) (Hoover and Hariander, 1993). Pada metode difusi agar, komponen antibakteri terdifusi dalam agar sehingga menghambat pertumbuhan bakteri indikator. Penghambatan positif bila terbentuk zona jernih (*clear zone*) di sekitar koloni, besarnya zona jernih yang terbentuk menunjukkan hasil difusi komponen antibakteri dan laju pertumbuhan bakteri indikator (Unton, 1983). Metode difusi agar lainnya adalah metode sumuran (*agar well diffusion assay*) yaitu supernatan dari bakteri penghasil bakteriosin dimasukkan ke dalam sumuran yang diletakkan di atas agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri indikator. Adanya zona jernih di sekitar sumuran menunjukkan bahwa bakteri tersebut positif menghasilkan bakteriosin (De Vuyst and Vandamme, 1994). Metode difusi agar lain yang lebih mudah dan lebih cepat dilakukan adalah metode simultan. Metode ini dikenal dengan prosedur *spot-on-lawn* yang dikenalkan oleh Gratia (1946), metode ini dilakukan dengan cara bakteri indikator dan bakteri penghasil bakteriosin ditumbuhkan secara bersamaan pada media padat yang sama. Bakteri indikator disebar pada permukaan agar dan bakteri penghasil bakteriosin diinokulasikan di atasnya. Muncunya zona jernih menunjukkan adanya aktivitas bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri indikator (Hoover and Hariander, 1993). Namun metode ini memiliki kelemahan bila digunakan untuk melakukan skrining terhadap bakteri penghasil bakteriosin karena munculnya zona jernih tidak hanya disebabkan karena adanya aktivitas bakteriosin namun dapat disebabkan karena pengaruh asam yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, sehingga masih diperlukan teknik lain untuk melakukan skrining. Metode pengenceran (*Critical Dilution Method*) merupakan metode kuantitatif untuk menguji besarnya aktivitas bakteriosin. *Arbitrary units* (AU) merupakan satuan yang digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri (Hoover and Hariander, 1993). Satu *Arbitrary units* merupakan sejumlah 5 µl hasil pengenceran tertinggi supernatan bakteriosin yang menghasilkan zona penghambatan terhadap bakteri indikator (Nielson *et al.*, 1990). Metode ini dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran kemudian memindahkan sejumlah 5 µl atau lebih dari masing-masing

pengenceran pada permukaan agar yang telah ditumbuhi bakteri indikator. Setelah diinkubasi, akan terlihat zona penghambatan sampai pada pengenceran tertentu yaitu sedikitnya 1-2 mm. Nilai pengenceran tertinggi yang diperoleh kemudian dikalikan dengan faktor konversi (bila suplematan yang digunakan sebanyak 5 μ l maka perhitungan memakai faktor konversi 200, yaitu diperoleh dari 1 ml dibagi 5 μ l) untuk mendapatkan AU/ml (Gonzales and Kunka, 1987; Bhunia *et al.*, 1988; Bhunia *et al.*, 1991). Metode pengenceran ini memiliki keuntungan bila digunakan untuk melakukan skrining secara kuantitatif, karena suplematan yang digunakan diperlakukan terlebih dahulu dengan pemanasan serta pengaturan pH (pH 6-6,5) sehingga zona jernih yang muncul disebabkan karena aktivitas bakteriosin bukan karena adanya pengaruh asam. Selain itu dengan menggunakan metode pengenceran ini akan dapat diketahui sampai seberapa jauh kemampuan suatu bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain.

2.4 Aplikasi Bakteriosin

Bakteriosin memiliki keterbatasan dalam melakukan penghambatan terhadap bakteri lain yaitu hanya mampu menghambat bakteri yang memiliki hubungan kekerabatan dekat sehingga aplikasi bakteriosin pada umumnya diujikan untuk bahan pangan yang disimpan dingin seperti susu, produk daging dan keju. Holla (1990) melaporkan bahwa penggunaan pediocin AcH sebagai biopreservasi terhadap produk pangan yang disimpan dingin (ice cream, susu, daging, saus, susu dan keju) sangat efektif karena terjadi penurunan yang sangat cepat terhadap jumlah bakteri pembusuk yang tumbuh. Setelah penyimpanan minggu ke 3, populasi bakteri pembusuk mengalami penurunan sebesar 3 siklus log bila dibandingkan dengan kontrol. Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* memiliki kemampuan penghambatan dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri patogen *Listeria monocytogenes* yang tumbuh dalam daging segar (fresh meat). Penghambatan ini dibuktikan dengan kemampuan bakteriosin dalam mengurangi jumlah bakteri sampai 0,5-2,2 siklus log. Stabilitas penghambatan bakteriosin masih dapat bertahan sampai pada hari ke 28 penyimpanan dingin daging segar (Nielsen *et al.*, 1990). Kalchayanand (1990) menyebutkan bahwa pada awal penyimpanan, pediocin AcH mampu menurunkan jumlah sel bakteri psikotropik *Leuconostoc mesenteroides* sebesar 2.5 siklus log pada produk daging

kemasan vakum yang disimpan dalam suhu 3° C. Setelah 8 minggu penyimpanan pediocin AeH mampu menurunkan sel sebesar 2 siklus log dan selanjutnya setelah 12 minggu penyimpanan penurunan sel mencapai 1 siklus log.

Rahayu *et al.* (1988) dalam penelitiannya memperoleh hasil bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* TGR-2 mampu memperpanjang masa simpan susu pasteurisasi sampai 55 hari.

Kim *et al.* (1993) melaporkan bahwa penggunaan bakteriosin yang dihasilkan *Pediococcus acidilactici* KFRI 168 memiliki spektrum penghambatan terhadap beberapa strain bakteri seperti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus faecium* pada proses fermentasi saus. Bakteriosin ini mampu menurunkan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* dan *Listeria monocytogenes* berturut-turut sebesar 2.8, 2.3, 2.4, 0.7 dan 0.5 siklus log.

Nisin Z dapat digunakan sebagai pengawet alami pada produk udang untuk menggantikan pengawet kimia sodium benzoat-potasium sorbat. Pengawet kimia ini dapat menurunkan kualitas warna produk (warna memudar berubah menjadi kekuningan) sebaliknya pemakaian nisin Z tetap dapat mempertahankan kesegaran produk selama 5 minggu pada penyimpanan suhu dingin (Einarson dan Lauzon, 1995). Selanjutnya Eckner (1991) menyatakan bahwa nisin berpotensi untuk diaplikasikan pada produk ikan yang disimpan pada suhu 10° C, karena nisin mampu mengurangi terjadinya pembusukan ikan yang disebabkan oleh clostridia dan bakteri anaerob fakultatif.

Ryan *et al.* (1996) melaporkan bahwa *Lactococcus lactis* mampu menghasilkan bakteriosin lacticin 3147 yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri pembusuk Gram positif yang tidak dikehendaki selama pembuatan keju. Selanjutnya Tanaka *et al.*, (1986) mengemukakan bahwa aplikasi nisin pada pembuatan keju mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang menghasilkan toksin yang dikenal sebagai *Clostridium botulinum*. Pemberian nisin sebesar 500 HJ/g terbukti efektif menghambat pertumbuhan dan pembentukan toksin oleh *Clostridium botulinum*.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. yang dilaksanakan mulai bulan Juli –Nopember 2008.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan meliputi, otoklaf, seperangkat alat elektroforesis, sentrifus, freezer, inkubator, pH meter (Mert Ohm), membran dialisis (Sigma), spektrofotometer UV-Vis (Beckman), kolom kromatografi (1,0 X 20 cm) (Pharmacia), fraction collector (Pharmacia), vortex, cawan petri, tabling reaksi, labu Erlenmeyer, labu takar, beaker-glass, refrigerator, freeze dryer,

Isolat bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 13 isolat BAL yaitu AIS-11, AIS-12, AIS-13, AIS-14, AIS-15, AIS-16, AIS-17, AIS-18, ESR-1, ESK-2, ESR-3, ESR-9, ESR-11, SM-25, SM-26, SM-28, SM-32, SM-46, BK-8, BR-1 706 yang diduga sebagai penghasil bakteriosin. *Pediococcus acidilactici* LB 42 digunakan sebagai bakteri indikator dan *Pediococcus acidilactici* F penghasil pediocin AcH digunakan sebagai bakteri standar dalam uji aktivitas bakteriosin. Penyirnpaan isolat sebagai stok dilakukan pada suhu -80°C , yaitu dengan menempatkan sel yang berumur 16 jam ke dalam tabung eppendorf yang berisi campuran gliserol 10% dan susu skim 20% (1:1).

Medium yang digunakan ada beberapa macam, yaitu medium TGE cair (tryptone, glucose, yeast extract) digunakan untuk produksi dan pemeliharaan kultur. Komposisi media TGE cair adalah : 2% tripton, 2% glukosa, 2% yeast ekstrak, 0,2 tween 80, 0,01% tween 80, 0,01% $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan pengaturan pH 6,5 (Biswas, et al., 1991). Medium TGE agar-lunak (soft agar) digunakan untuk overlay bakteri indikator. Komposisi medium TGE agar tidak sama dengan medium TGE cair namun dengan penambahan agar 0,75%. Media medium TGE agar-keras digunakan untuk plating. Komposisi medium TGE agar-keras sama dengan medium TGE cair namun dengan penambahan agar 1,5%.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

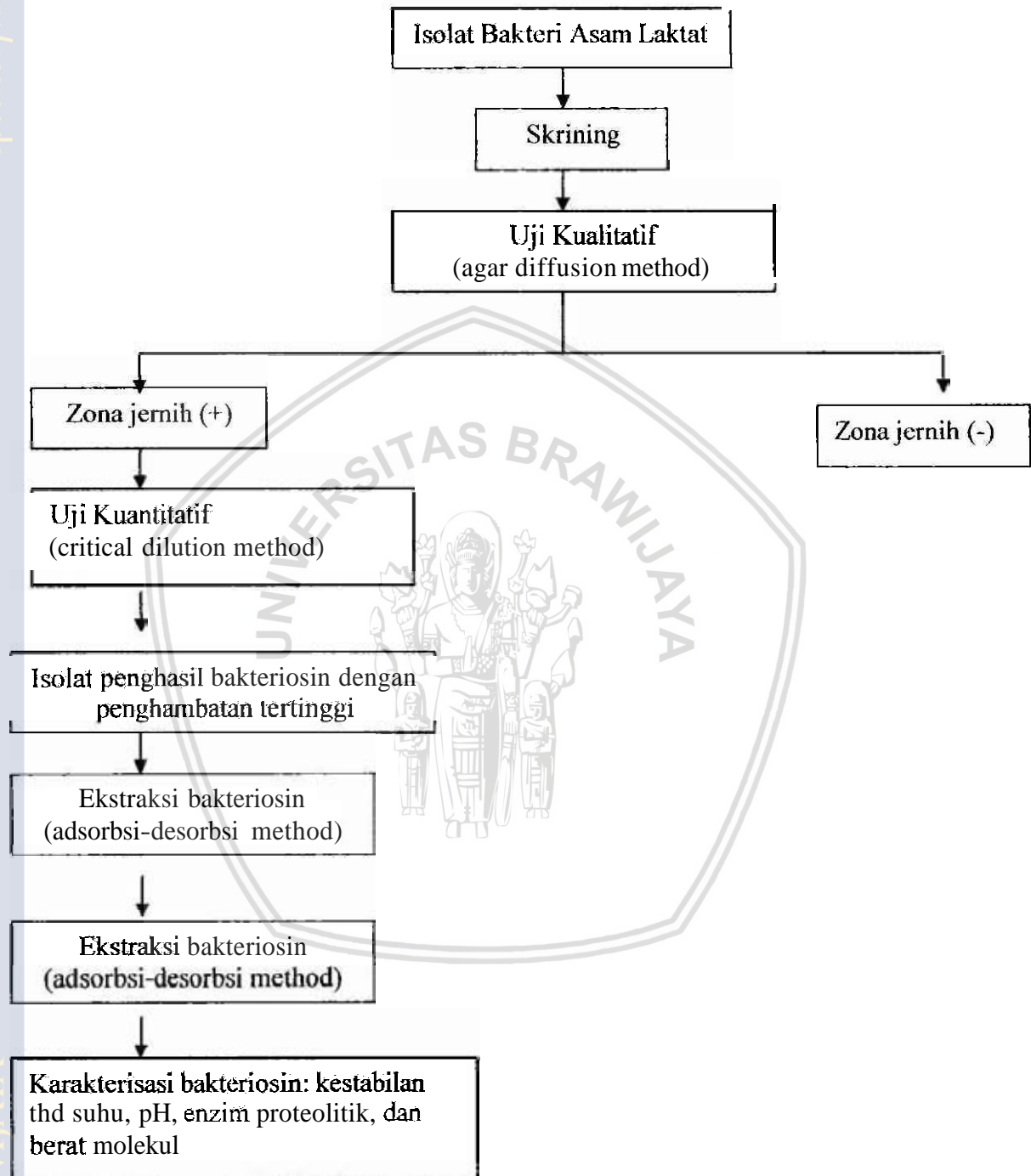
Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi skrining terhadap isolat BAL penghasil bakteriosin secara kualitatif. Selanjutnya dilakukan skrining secara kuantitatif. Setelah didapatkan isolat penghasil bakteriosin yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi selanjutnya dilakukan ekstraksi dan purifikasi bakteriosin. Tahap terakhir adalah melakukan karakterisasi bakteriosin dengan melihat stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh perlakuan suhu, pH, enzim proteolitik, serta menentukan berat molekul bakteriosin.

3.4 Analisis Penelitian

1. Skrining BAL secara kualitatif

Skrining terhadap bakteri asam laktat dilakukan dua tahap, tahap pertama dilakukan uji kualitatif untuk memilih isolat penghasil bakteriosin dengan menggunakan metode *agar diffusion techniques*, tahap kedua dilakukan uji kuantitatif untuk memilih isolat penghasil bakteriosin yang memiliki aktivitas penghambatan tertinggi dengan menggunakan *critical dilution method* (Daba *et al.*, 1991). Uji kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri asam laktat dalam medium cair TGE pada 30° C, 24 jam. Kemudian dilakukan seri pengenceran kultur bakteri asam laktat sampai pengenceran 10⁻⁵ (tergantung pada pertumbuhan bakteri asam laktat). 100 µl kultur dari pengenceran 10⁻⁵ sampai 10⁻⁶ masing-masing dipindahkan dalam cawan petri. Pada masing-masing cawan petri dituangkan medium TGE agar-keras (suhu medium mencapai 48° C) sebanyak 5 ml. Bila medium sudah memadat (15 menit) selanjutnya dituangkan medium TGE agar-keras (suhu medium mencapai 50° C) sebanyak 4 ml untuk menutup permukaan sehingga dapat dihindari pertumbuhan bakteri pada bagian permukaan agar. Setelah medium memadat (15 menit), semua cawan petri diinkubasi pada suhu 30° C selama 2 hari atau sampai terlihat pertumbuhan koloni. Setelah koloni tumbuh selanjutnya dituang 5 ml medium TGE agar-hmak (48° C) yang telah diinokulasi 5 µl bakteri indikator (umur 24 jam). Inkubasi dilakukan pada suhu 30° C selama 24 jam untuk mengetahui adanya penghambatan pertumbuhan bakteri indikator oleh bakteri asam laktat yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih. Penghambatan

pertumbuhan bakteri indikator ini disebabkan karena **produksi** senyawa **antibakteri** oleh bakteri asam laktat.



Gambar 3. Diagram Alir Tahapan Penelitian

2. Skrining BAL Secara Kuantitatif

Skrining tahap kedua dilakukan terhadap isolat yang menunjukkan zona jernih. Skrining ini dilakukan dengan cara menuang 5 ml medium TGE agar-keras (48° C) dibiarkan memadat (15 menit), kemudian medium TGE agar-lunak yang telah diinokulasi dengan 5 µl bakteri indikator (10^5 - 10^6) dituangkan di atasnya dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 4° C selama 1 jam. Lima mikroliter supernatan bakteri asam laktat yang telah diencerkan pada berbagai level dispotkan pada permukaan medium TGE agar yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42. Supernatan diperoleh dengan melakukan sentrifugasi kultur broth (15.000 X g, 15 menit) kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 5 menit dengan tujuan untuk mematikan sel dan menghflangkan aktivitas enzim proteolitik. Dilakukan serial pengenceran (10X, 30X, 50X, ...) untuk mengetahui besarnya aktivitas penghambatan. Setelah supernatan dispotkan pada permukaan medium TGE agar selanjutnya dilakukan inkubasi pada 4° C selama 1 jam dan dilanjutkan inkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Aktivitas penghambatan dinyatakan sebagai Arbitrary Units (AU/ml), yaitu diperoleh dari pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan adanya aktivitas penghambatan (zona jernih). Misalnya pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan zona jernih adalah 50X maka besarnya aktivitas adalah $1000 \text{ ml} / 5 \mu\text{l} \times 50 = 10.000 \text{ AU/ml}$.

3. Ekstraksi (Adsorpsi-desorpsi) bakteriosin

Ekstraksi bakteriosin dilakukan dengan menggunakan metode adsorpsi-desorpsi sel (Elegado, et al., 1997) yaitu inokulum sebesar 1 ditumbuhkan pada medium TGE (500 ml), kemudian diinkubasi pada 30° C selama 16 jam. Selanjutnya kultur dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit untuk mematikan sel dan merusak aktivitas enzim proteolitik. Selanjutnya pH diatur sampai 6,5 menggunakan 10 mM NaOH, dengan tujuan agar terjadi adsorpsi bakteriosin pada sel kemudian dilakukan stiring pada 4° C selama 24 jam untuk membantu proses adsorpsi. Untuk mendapatkan sel selanjutnya dilakukan sentrifugasi 15.000 X g selama 15 menit. Pelet yang didapat selanjutnya dicuci dengan 2 mM Na_2HPO_4 dan dilakukan resuspensi sel dalam 60 ml 100 mM NaCl kemudian pH diatur sampai mencapai pH 2,5 dengan menggunakan HCl. Stiring dilakukan pada suhu 40C selama 24 jam. Langkah selanjutnya dilakukan sentrifugasi

29.000 X g selama 30 menit. Pelet (sel) dilarutkan dalam 60 ml dH₂O, untuk menghilangkan efek NaCl maka supernatan yang dihasilkan didialisis dengan membran dialisis (cut off 3500) pada 4°C selama 2 jam (aquades diganti tiap 0,5 jam). Dialisat dikering bekukan (*freeze drying*) selama 24 jam selanjutnya disimpan pada suhu -10° C sebelum digunakan.

4. Karakterisasi bakteriosin

Karakterisasi yang dilakukan meliputi uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu, enzim proteolitik, pH, dan berat molekul bakteriosin.

a. Stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu

Uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu dilakukan dengan memanasi sampel dalam air mendidih (100° C) selama 15 menit, didinginkan dan dilakukan uji aktivitas penghambatannya. Sampel lainnya diperlakukan pada suhu 121°C selama 15 menit, didinginkan dan dilakukan uji aktivitas penghambatan. Pengujian adalah sebagai berikut: 5 µl sampel dispotkan pada medium TGE agar yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam, dan dilakukan pengamatan aktivitas bakteriosin yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih.

b. Stabilitas Bakteriosin terhadap Pengaruh Enzim Proteolitik

Uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh enzim proteolitik dilakukan dengan cara melarutkan enzim proteolitik dalam 4 mM/l bufer fosfat pH 7,0 pada konsentrasi 200 µg/ml. Kemudian ditambahkan sampel sehingga konsentrasi 10 mg/ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 30° C selama 1 jam. Pengujian aktivitas bakteriosin adalah sebagai berikut: 5 µl sampel dispotkan pada medium TGE agar yang telah dilakukan *overlay* dengan medium TGE agar-Iunak yang mengandung bakteri indikator. Selanjutnya inkubasi dilakukan pada suhu 30° C selama 24 jam dan dilakukan pengamatan aktivitas bakteriosin yang ditandai dengan munculnya zona jernih.

c. Stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh pH dan suhu

Uji stabilitas bakteriosin terhadap pH dilakukan dengan cara melarutkan sampel dalam air bebas ion dengan konsentrasi akhir 50 mg/ml. Sampel kemudian diatur dengan menggunakan 10 mM/l NaOH steril atau 10 mM/l HCl untuk mencapai beberapa tingkat pH yaitu antara 2,0 sampai 12. Inkubasi 1) 25° C, 2 jam 2) 25° C, 24 jam 3) 100°C, 20 menit. Sampel kemudian diatur untuk mencapai pH 7,0 dengan 4 mM/l bufer fosfat steril. Pengujian adalah sebagai berikut: semua sample dipanaskan selama 3 menit dan 5 pi sampel dispotkan pada medium TGE agar yang telah di overlay dengan TGE agar-lunak yang mengandung bakteri indikator. Munculnya zona jernih yang merupakan penghambatan pertumbuhan terhadap bakteri indikator menunjukkan adanya aktivitas bakteriosin.

e. Penentuan Berat Molekul Bakteriosin

Penentuan berat molekul dilakukan dengan SDS-PAGE dengan konsentrasi gel 16% yaitu dengan mengukur mobilitas protein dalam PAGE yang mengandung SDS. Protein standar yang sudah diketahui BM-nya juga dielektroforisis untuk diukur mobilitasnya. Mobilitas protein diperoleh dengan mengukur jarak perpindahan protein dari perbatasan *stacking gel* dan *resolving gel* sampai pita protein yang dimaksud (a cm), selanjutnya diukur pula jarak perpindahan larutan dari perbatasan *stacking* dan *resolving gel* ke batas terbawah (b cm). Selanjutnya nilai $R_f = a/b$, diplotkan dalam kertas semi log dengan R_f pada sumbu x dan BM pada sumbu y. Data yang didapat dari nilai R_f dan BM yang diplotkan ke kertas semi log selanjutnya digunakan untuk memperoleh kurva standar protein. Protein yang akan diketahui berat molekulnya dihitung dengan menarik nilai R_f ke kurva standar kemudian dihubungkan ke sumbu y. Berat molekul protein standar yang digunakan adalah Albumin (66 kDa), Chicken egg albumin (45 kDa), Glyseraldehyde 3 Phosphate dehidrogenase (36 kDa), Rabbit muscle (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa), lactalbumin (14,2 kDa), Aprotinin (6,5 kDa).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Skrining BAL Secara Kualitatif

Dua puluh satu isolat bakteri asam laktat (BAL) berhasil diisolasi dari bermacam-macam produk daging yang dipasarkan di Indonesia (Tabel 3). Beberapa isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari produk daging antara lain BR-1, BR-8, BR706, SM-25, SM-26, SM-28, SM-32, SM-46, ESR-I, ESR-2, ESR-3, ESP.-9, ESR-11, AIS-11, AIS-12, AIS-13, AIS-14, AIS-15, AIS-16, AIS-17 dan AIS-18.

Bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan BAL yang diisolasi dari produk daging hal ini dimaksudkan untuk memperoleh isolat BAL yang mampu menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas antibakteri yang tinggi. Seperti diketahui bahwa BAL dapat ditemukan baik pada bahan nabati (*plant origin products*) maupun bahan hewani (*meat/fish products*) Namun sejauh ini beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa BAL yang mampu menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas antibakteri tinggi banyak ditemukan pada bahan hewani misalnya ikan, keju dan produk daging. Sedangkan BAL yang telah berhasil diisolasi dari bahan nabati seperti produk-produk fermentasi misalnya growol, tempoyak, tempe, asinan terung serta asinan rebung merupakan BAL yang menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas antibakteri rendah (Djaafar, 1994). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut maka pemakai isolat BAL dari produk daging diharapkan akan berhasil mendapatkan BAL yang berpotensi menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas antibakteri tinggi. Kemampuan isolat BAL dalam menghasilkan bakteriosin dapat diketahui dengan melakukan skrining awal yaitu menggunakan uji kualitatif (*agar diffusion techniques*),. Skrining tahap awal terhadap 21 isolat BAL yang digunakan, memperlihatkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan munculnya zona jernih di sekitar koloni bakteri asam laktat. Sebagai pembanding digunakan *Pediococcus acidilactici* F yang telah diketahui positif menghasilkan bakteriosin.

Tabel 3. Hasil isolasi bakteri asam laktat dari produk daging

No.	Nama isolat	Sumber/poduk	Aktivitas antibakteri
1	SM - 25	Daging iris kemasan vakum	+**
2	SM - 26	Daging iris kemasan vakum	+**
3	SM - 28	Daging iris kemasan vakum	+*
4	SM - 32	Daging iris kemasan vakum	+**
5	SM - 46	Daging iris kemasan vakum	+**
6	ESR - 1	Daging iris kemasan vakum	+**
7	ESR - 2	Daging iris kemasan vakum	+**
8	ESR - 3	Daging iris kemasan vakum	+**
9	ESR - 9	Daging iris kemasan vakum	+**
10	ESR - 11	Daging iris kemasan vakum	+**
11	AIS - 11	Sosis daging ayam	+*
12	AIS - 12	Sosis daging ayam	+*
13	AIS - 13	Sosis daging ayam	+*
14	AIS - 14	Sosis daging ayam	+*
15	AIS - 15	Sosis daging ayam	+*
16	AIS - 16	Sosis daging ayam	+*
17	AIS - 17	Sosis daging ayam	+*
18	AIS - 18	Sosis daging ayam	+*
19	BR - 8	Daging iris kemasan vakum	+**
20	BR - 1	Daging iris kemasan vakum	+**
21	BR - 706	Daging iris kemasan vakum	+**

+ , aktivitas antibakteri positif ditandai terbentuknya zona jernih

*, zona jernih yang terbentuk karena aktivitas asam

** , zona jernih yang terbentuk karena aktivitas bakteriosin

Tabel 3 menunjukkan hasil skrining awal bahwa aktivitas antibakteri yang disebabkan oleh asam (zona jernih yang terbentuk tidak jelas dan tidak tegas) tampak pada isolat SM-28, AIS-1 L AIS-12, AIS-13, AIS-14, AIS-15, AIS-16, AIS-17 dan AIS-18. Sedangkan aktivitas antibakteri yang disebabkan karena bakteriosin (zona jernih yang terbentuk jelas dan tegas) tampak pada isolat SM-25, SM-26, SM-32, SM-46, ESR-I, ESR-3, ESR-9, ESR-11, BR-706, BR-1 dan BR-8.

4.2. Skrining BAL Secara Kuantitatif

Skrining secara kuantitatif dilakukan terhadap isolat yang memiliki hasil positif pada tahap skrining secara kualitatif. Skrining secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran (*critical dilution method*). Metode ini bertujuan untuk mengetahui sampai seberapa besar penghambatan bakteriosin terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42. Besarnya aktivitas penghambatan dinyatakan sebagai *arbitrary units* (AU/ml) yaitu besarnya pengenceran terakhir yang masih mampu memberikan penghambatan terhadap bakteri indikator (Daba *et al.*, 1994) Dengan demikian, manfaat digunakannya metode pengenceran ini adalah dapat ditentukan isolat yang mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator tertinggi. Bakteri indikator yang digunakan dalam skrining ini adalah *Pediococcus acidilactici* LB 42, pemilihan bakteri indikator ini didasarkan atas sifat sensitifitasnya terhadap bakteriosin. *Pediococcus acidilactici* LB 42 memiliki sensitifitas tertinggi terhadap bakteriosin diantara bakteri indikator lain yang digunakan. Selain itu pemilihan bakteri indikator didasarkan atas sifat resistensinya terhadap asam. *Pediococcus acidilactici* LB 42 memiliki resistensi tinggi terhadap asam sehingga penghambatan pertumbuhan bakteri indikator yang terjadi (munculnya *clear zone*) benar-benar disebabkan karena bakteriosin bukan karena asam. Pada skrining secara kuantitatif ini berhasil diperoleh 12 isolat yang tetap menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator dengan besar aktivitas penghambatan bervariasi. Tabel 4 menyajikan besarnya aktivitas penghambatan yang dihasilkan oleh isolat yang didapat. Terlihat bahwa isolat yang secara kualitatif menghasilkan zona jernih dengan tepi lingkaran kabur tidak terdeteksi aktivitasnya pada uji kuantitatif sebaliknya isolat yang secara kualitatif menghasilkan zona jernih dengan tepi lingkaran jernih dan tegas akan tetap terdeteksi aktivitasnya pada uji kuantitatif. Hal ini terjadi karena pada uji kualitatif tidak dilakukan pengaturan pH untuk menetralkan asam maupun pemanasan sehingga aktivitas yang disebabkan oleh bakteriosin maupun asam akan muncul sedangkan pada

uji kuantitatif dilakukan pengaturan pH maupun pemanasan sehingga aktivitas yang muncul hanya aktivitas yang disebabkan oleh bakteriosin. Dari kedua belas isolat tersebut, maka dipilih isolat yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator tertinggi. Dari uji kuantitatif yang dilakukan didapat hasil bahwa isolat yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42 karena adanya bakteriosin hanya ditunjukkan oleh isolat SM-25, SM-26, SM-32, SM-46, ESR-1, ESR-2, ESR-3, ESR-9, ESR-11, BR-706, BR-1, dan BR-8.

Tabel 4 Hasil uji kuantitatif aktivitas antibakteri BAL terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42

No.	Isolat	Aktivasi antibakteri (AU/ml)
1	SM-25	200
2	SM-26	200
3	SM-28	tidak terdeteksi
4	SM-32	6000
5	SM-46	10.000
6	ESR-1	200
7	ESR-2	200
8	ESR-3	200
9	ESR-9	200
10	ESR-11	200
11	AIS-I1	tidak terdeteksi
12	AIS-I2	tidak terdeteksi
13	AIS-13	tidak terdeteksi
14	AIS-14	tidak terdeteksi
15	AIS-15	tidak terdeteksi
16	AIS-16	tidak terdeteksi
17	AIS-17	tidak terdeteksi
18	AIS-18	tidak terdeteksi
19	BR-1	2000
20	BR-706	200
21	BR-8	18.000

Sedangkan 10 isolat lainnya tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Tidak munculnya aktivitas antibakteri ini disebabkan adanya dua kemungkinan yaitu metode yang digunakan tidak mampu mendeteksi bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL karena kadar bakteriosin yang dihasilkan sangat rendah. Kemungkinan kedua adalah bakteri indikator yaitu *Pediococcus acidilactici* LB 42 yang digunakan tidak sensitif terhadap bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Aktivitas bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL yang didapat pada penelitian ini pada umumnya masih rendah, hanya beberapa isolat yang menunjukkan aktivitas tinggi yaitu SM-46 yaitu sebesar 10.000 AU/ml dan BR-8 yaitu sebesar 18.000 AU/ml. Berdasarkan hasil uji kuantitatif yang diperoleh maka isolat BR-8 digunakan sebagai isolat penghasil bakteriosin.

4.3 Ekstraksi Bakteriosin dari Isolat HR-8

Ekstraksi bakteriosin dilakukan terhadap isolat BAL yang menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi yaitu isolat BR-8. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode adsorpsi-desorpsi yang dilakukan dengan menggunakan pH 6,5 dengan tujuan agar bakteriosin teradsorpsi pada permukaan sel. Penggunaan pH 6,5 ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Yang *et al* (1992) dan Van't Hul dan Gibbson (1996,) bahwa adsorpsi maksimum bakteriosin dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* terjadi pada pH 6.5 dan adsorpsi tidak terjadi lagi saat mencapai pH dibawah 3,0. Selanjutnya sel beserta bakteriosin yang menempel pada permukaannya dipisahkan dari larutan kultur dengan sentrifugasi. Proses desorpsi pada penelitian ini digunakan pH 2,5. Yang *et al* (1992) menyatakan bahwa pelepasan bakteriosin (desorpsi) dari sel terjadi pada pH dibawah 3,0. Pada penelitian ini dilakukan optimasi pH untuk pelepasan bakteriosin dari permukaan sel. Variasi pH yang digunakan adalah pH 2,0, pH 2,5 dan pH 3.0. Dari beberapa pH yang digunakan memperlihatkan hasil bahwa pH 2.5 merupakan pH yang menghasilkan pelepasan bakteriosin tertinggi.

Percobaan bakteriosin oleh isolat BR-8 pada beberapa tahapan ekstraksi disajikan pada Tabel 5.

Bakteriosin merupakan senyawa antibakteri yang bersifat ekstraseluler yang disekresikan bakteri ke dalam medium. Yang *et al* (1992) menyebutkan bahwa untuk mempelajari sifat-sifat bakteriosin dan menentukan efektivitas bakteriosin bila diaplikasikan pada bahan pangan, perlu dilakukan suatu usaha untuk mendapatkan bakteriosin dalam jumlah besar serta dalam bentuk murni. Metode presipitasi dengan menggunakan amonium sulfat telah banyak digunakan dalam usaha untuk memperoleh bakteriosin murni. Namun terbukti bahwa metode ini tidak memuaskan karena hasil yang diperoleh belum menunjukkan tingkat kemurnian yang diharapkan, karena protein lain selain bakteriosin yang berada dalam medium juga akan mengalami presipitasi (Bhunia *et al.*, 1988; Davey dan Richardson, 1981). Selain itu untuk keperluan penentuan komposisi dan sekuensing asam amino yang pada dasarnya membutuhkan protein dengan tingkat kemurnian tinggi, maka akan dibutuhkan beberapa teknik kolom kromatografi untuk purifikasi lebih lanjut sampai dihasilkan bakteriosin dalam keadaan murni (Yang *et al.*, 1992). Usaha untuk mendapatkan bakteriosin dalam keadaan relatif murni dengan cara yang lebih mudah terus dikembangkan. Bhunia *et al.* (1991). mempelajari mekanisme penghambatan pediocin AcH terhadap *Lactobacillus plantarum* NCDO 955 dan berhasil mengamati bahwa adsorpsi pediocin AcH pada sel dipengaruhi oleh pH. Pada umumnya sel penghasil bakteriosin akan mengadsorpsi bakteriosin yang dihasilkan olehnya. Berdasarkan sifat tersebut maka dengan melakukan pengaturan pH tertentu, bakteriosin akan teradsorpsi pada sel dan pada pH tertentu pula bakteriosin akan terlepas dari sel. Kemudian hasil ekstraksi ini telah terbukti seperti yang dilaporkan oleh Motlagh *et al.* (1992) yaitu telah dilakukan transfer protein pediocin AcH dari gel pada membran transblot dan membran tersebut telah berhasil digunakan untuk sekuensing peptida secara parsial.

Tabel 5. Hasil bakteriosin pada beberapa tahapan ekstraksi

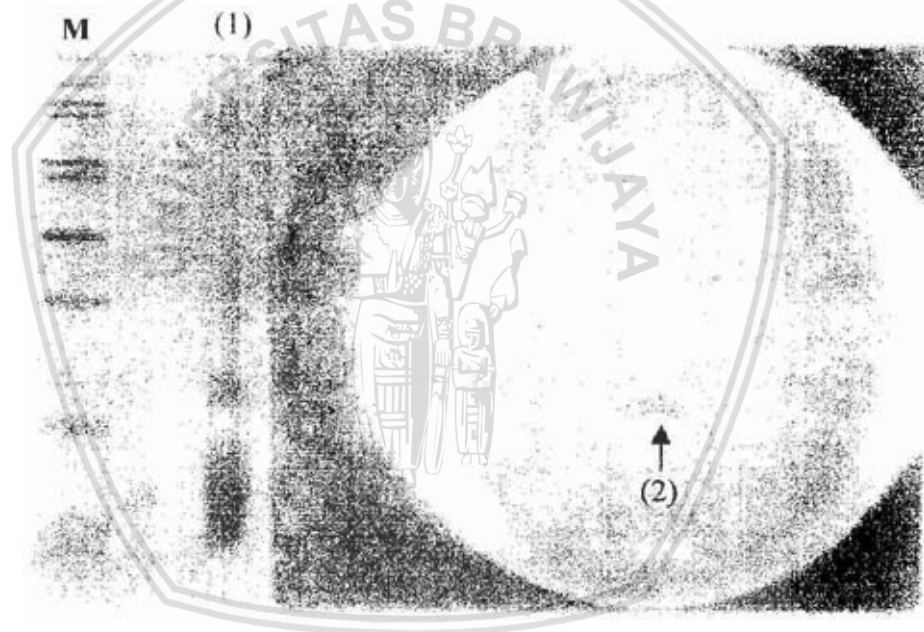
Hasil bakteriosin	AU/ml	AU (%)
Total bakteriosin dalam kultur broth (500 ml)	18.000	$9,0 \times 10^6$ (100%)
Bakteriosin yang tidak teradsorbsi (500 ml)	200	$1,0 \times 10^5$ (1,1%)
Bakteriosin yang tidak terdesorbsi (60 ml)	4.000	$2,4 \times 10^5$ (2,6%)
Total bakteriosin yang terekstrak (60 ml)	64.000	$3,8 \times 10^6$ (42,2%)

Tahapan ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berapa banyak bakteriosin yang dihasilkan serta untuk mengetahui bakteriosin yang hilang selama tahapan ekstraksi. Penggunaan pH 6,5 untuk adsorbsi didasarkan pada asumsi bahwa pada pH tersebut bakteriosin yang bersifat kationik akan menempel pada receptor sel yang bermuatan negatif. Terlepasnya bakteriosin kembali dari dinding sel karena perlakuan pH 2,5 disebabkan karena pada kondisi asam ion H^+ berlebih sehingga mampu menggantikan bakteriosin yang terikat pada receptor dinding sel. Pada Tabel 5 terlihat bahwa bakteriosin yang dihasilkan dengan metode adsorbsi-desorbsi yaitu sebesar 42,2%. Bakteriosin yang hilang dalam supernatan atau bakteriosin yang tidak teradsorbsi saat perlakuan dengan pH 6,5 sebesar 1,1%. Sedangkan kehilangan bakteriosin dalam sel atau bakteriosin yang tidak terlepas dari sel saat perlakuan pH 2,5 adalah sebesar 2,6%. Hasil ini memiliki kemiripan dengan hasil yang dilaporkan oleh Yang *et al.* (1992) yaitu ekstraksi bakteriosin bervariasi tergantung jenis bakteri asam laktat dan kondisi adsorbsi-desorbsi yang digunakan. Ekstrak yang dihasilkan berkisar antara 44,3 sampai 100%. Kehilangan bakteriosin yang terjadi dalam supernatan berkisar antara 0 sampai 7,7% sedangkan kehilangan bakteriosin dalam sel berkisar antara 0,6 sampai 2,3%. Selama proses ekstraksi digunakan NaCl hal ini ditujukan untuk menghindari terjadinya pengendapan molekul bakteriosin serta membantu proses desorbsi molekul bakteriosin dari sel (Elegado *et al.*, 1997). Rendahnya hasil ekstraksi pada penelitian ini dimungkinkan karena terjadinya kerusakan bakteriosin

saat proses ekstraksi berlangsung, selain itu disebabkan karena adanya aktivitas enzim proteolitik yang dihasilkan BAL sehingga merusak aktivitas antibakteri bakteriosin

4.4. Deteksi Aktivitas Bakteriosin dari isolat BR-8 dalam SDS-PAGE.

Deteksi aktivitas bakteriosin dengan menggunakan SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui berapa banyak pita protein yang dihasilkan setelah tahap ekstraksi dilakukan serta berapa banyak pita protein yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator. Bakteriosin yang dihasilkan pada tahapan ekstraksi selanjutnya dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE (16%).



Gambar 4. Hasil deteksi aktivitas bakteriosin dari isolat BR -8 dalam SDSPAGE. (1) pita protein hasil ekstraksi isolat BR-8. (2) pita protein yang menunjukkan aktivitas bakteriosin. Anak panah menunjukkan pita protein (bakteriosin) yang memiliki aktivitas antibakteri. Bakteri indikator yang digunakan adalah *Pediococcus acidilactici* LB 42. M: marker

Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat **banyak** pita protein (Gambar 4). Ketika dibandingkan dengan gel yang digunakan untuk uji **aktivitas** antibakteri, maka salah satu pita protein menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42 (Gambar 4). Dapat diambil kesimpulan bahwa hanya ada satu pita protein yang menghasilkan bakteriosin, yaitu dengan munculnya zona bening atau satu zona penghambatan pertumbuhan bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LB 42.

Bhunia *et al* (1987) melaporkan bahwa dengan menggunakan SDS - PAGE dapat digunakan untuk mengidentifikasi pita protein tertentu yang memiliki aktivitas antibakteri. Selanjutnya Bhunia (1987) telah melakukan deteksi senyawa antibakteri yang dihasilkan *Pediococcus acidilactici* dalam SDS-PAGE dan hasilnya menunjukkan terdapat beberapa pita protein yang mempunyai kisaran BM antara 2,7 kDa - 50 kDa. Pada gel hasil elektroforesis menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ditandai dengan munculnya zona jernih yang merupakan hasil penghambatan pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*. Setelah dibandingkan dengan BM standar maka zona jernih yang muncul hanya pada pita protein yang memiliki BM sebesar 2,7 kDa sedangkan protein lain tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

4.5 Purifikasi Bakteriosin dari Isolat BR-8 Menggunakan Kromatografi Penukar Anion

Setelah dilakukan deteksi aktivitas bakteriosin dengan menggunakan SDS-PAGE tahap selanjutnya adalah purifikasi bakteriosin hasil ekstraksi dengan menggunakan kromatografi penukar ion *DEAE-cellulose*. Tabel 6 menyajikan tahapan pemurnian bakteriosin melalui ekstraksi dan kromatografi penukar anion *DEAE-cellulose*. Pemurnian bakteriosin dengan menggunakan metode adsorpsi-desorpsi mampu meningkatkan aktivitas spesifik bakteriosin sebesar 40,5 kali dibandingkan dengan aktivitas dari supernatan. Sedangkan pada tahap pemurnian

menggunakan kromatografi *DEAE-cellulose* diperoleh peningkatan aktivitas spesifik sebesar 136,1 kali dibandingkan aktivitas spesifik pada supemat. Hasil yang diperoleh dari tahap ini adalah sebesar 14,4%. Penurunan total aktivitas pada tahap akhir pemurnian, disebabkan karena adanya protein murni yang dihasilkan pada saat ekstraksi tidak terikat pada kolom. Sesuai dengan penelitian Jimenez-Diaz (1995) bahwa penurunan total aktivitas protein hasil purifikasi menggunakan kromatografi penukar ion terjadi karena terdapat materi dalam fraksi yang telah dimurnikan yang tidak terikat oleh kolom. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan apa yang dilaporkan oleh Barefoot dan Klaenhammer (1984) bahwa terjadi penurunan hasil sampai 3% yang disebabkan karena pada saat dilakukan pemisahan dengan kolom penukar ion terjadi adsorpsi supemat yang tidak sempurna dan tidak sepenuhnya proses desorpsi oleh resin selama proses penukaran ion. Lebih lanjut dinyatakan bahwa penurunan hasil ini diduga karena terjadi denaturasi bakteriosin selama proses purifikasi atau kemungkinan lain diduga karena tidak larutnya bakteriosin pada bufer yang memiliki konsentrasi garam tinggi. Stoffels *et al.* (1992) juga melaporkan bahwa terjadi penurunan hasil sampai 1% pada tahap akhir pemurnian carnocin U149, yang diduga karena terjadi inaktivasi bakteriosin selama proses purifikasi.

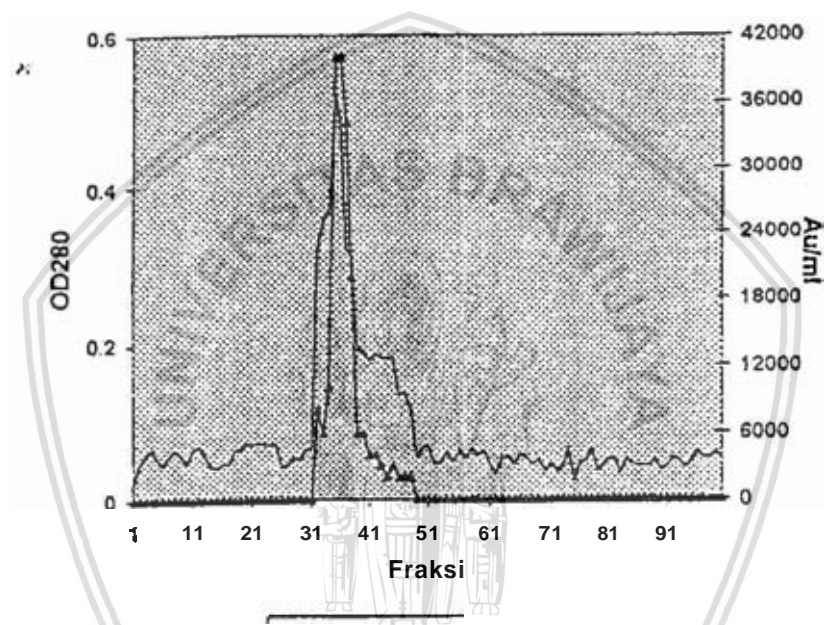
Tabel 6. Tahapan purifikasi bakteriosin dari isolat BR-8

Tahap	Vol (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas (AU/ml)	Total aktivitas (AU)	Akt.sps. AU/mg	Hasil (%)	Tk. Kemurnian
Kultur	500	9,6	18.000	$9,0 \times 10^6$	1836,7	100	1
Ekstraksi (adsorpsi-desorpsi)	60	0,86	64.000	$3,8 \times 10^6$	74418,6	42,2	40,5
<i>DEAE-cellulose</i>	32	0,16	40.000	$1,3 \times 10^6$	250000	14,4	136,1

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemurnian dengan menggunakan metode adsorpsi desorpsi menghasilkan tingkat kemurnian yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil pemurnian lactocin S dari *Lactobacillus sake* L45 yang

telah dilakukan oleh Mortvedt *et al* (1991). Pemurnian dilakukan dengan menggunakan presipitasi ammonium sulfat menghasilkan peningkatan spesifik sebesar 27 kali, tahap pemurnian selanjutnya menggunakan kromatografi penukar ion *Q-Sepharose* dengan peningkatan aktivitas spesifik sebesar 76 kali.

Gambar 5 menyajikan hasil elusi bakteriosin dari kromatografi penukar anion *DEAE-cellulose*. Sampel yang diaplikasikan pada pemurnian tahap ini adalah bakteriosin hasil ekstraksi dengan aktivitas penghambatan 64.000 AU/ml.



Gambar 5. Kromatografi penukar anion *DEAE cellulose* dari bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BR-8. Bakteriosin dielusi dengan gradien linier 0,1-1 M NaCl dalam bufer Fosfat pH 6,5; masing-masing fraksi (3 ml) dikumpulkan dan diukur aktivitasnya. (•) absorbansi pada 280 nm : (-) aktivitas bakteriosin

Elusi terhadap bakteriosin dilakukan dengan gradien linier 0,1-1 M NaCl dalam bufer fosfat pH 6,5. Kecepatan alir yang digunakan adalah 15 ml/jam. Profil hasil elusi pemurnian kromatografi penukar ion *DEAE-cellulose* menghasilkan satu puncak pada OD₂₈₀ dan aktivitas antibakteri bakteriosin

terdapat pada fraksi ke 32 sampai 47 dengan aktivitas tertinggi sebesar 40 000 AU/ml dan aktivitas terendah sebesar 2000 AU/ml Hasil elusi pada fraksi lain tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri

4.6. Karakterisasi Bakteriosin dari isolat BH-8

Karakterisasi meliputi penentuan berat molekul bakteriosin, stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu, enzim proteolitik, dan pH

1. Stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu

Hasil uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh panas menunjukkan bahwa bakteriosin tetap memiliki aktivitas antibakteri baik dengan perlakuan pemanasan 100^o C selama 15 menit maupun pemanasan 121^o C selama 15 menit

Stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh panas ini sangat menguntungkan karena diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai biopreservasi produk pangan yang melibatkan faktor pemanasan dalam pengolahannya Stabilitasnya aktivitas antibakteri terhadap perlakuan pemanasan diduga berkaitan dengan rendahnya BM yang dimiliki bakteriosin sehingga tidak berpengaruh terhadap perlakuan panas Seperti yang dinyatakan oleh Ray (1992) bahwa bakteriosin merupakan peptida rantai pendek yang stabil terhadap panas Dugaan lain bahwa adanya kandungan asam amino tertentu yaitu sistein yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh pemanasan sehingga bakteriosin tetap memiliki aktivitas antibakteri Hasil uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh suhu menunjukkan bahwa bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas antibakteri dengan pemanasan 100^o C selama 15 menit dan 121^o C selama 15 menit Kestabilan bakteriosin terhadap pemanasan menjadikan bakteriosin ini sangat berpotensi untuk digunakan sebagai pengawet pada produk makanan yang memerlukan pemanasan dalam proses pembuatannya

2. Stabilitas bakteriosin terhadap enzim proteolitik

Bakteriosin merupakan protein yang memiliki kemampuan bakterisidal terhadap bakteri lain. Uji sensitifitas bakteriosin terhadap enzim proteolitik bertujuan untuk membuktikan bahwa bakteriosin merupakan suatu molekul protein. Tabel 7 menyajikan hasil perlakuan beberapa enzim proteolitik terhadap aktivitas antibakteri bakteriosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berbagai enzim proteolitik menyebabkan hilangnya aktivitas antibakteri bakteriosin terhadap *Pediococcus acidilactici* LB 42. Hilangnya aktivitas penghambatan ini disebabkan karena enzim proteolitik memiliki kemampuan mendegradasi bakteriosin sehingga bakteriosin kehilangan aktivitas antihakterinya. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan isolat BR-8 merupakan molekul protein. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ray (1992) bahwa semua bakteriosin sensitif terhadap satu atau lebih enzim proteolitik.

Tabel 7. Hasil uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh enzim proteolitik

Perlakuan	Aktivitas antibakteri
Kontrol (tanpa penambahan enzim)	+
Ficin	-
Papain	-
Protease type XIV	-
Protease type XXIV	-

+ , terdapat aktivitas antibakten

- , tidak terdapat aktivitas antibakteri

Pembuktian bahwa bakteriosin adalah protein telah dilakukan oleh Davey dan Richardson (1981) yaitu perlakuan bakteriosin dengan pronase, tripsin, dan α -kimotripsin menyebabkan bakteriosin kehilangan aktivitas antibakteri. Hal serupa juga dikemukakan oleh Kojic et al (1991) bahwa bakteriosin kehilangan aktivitasnya setelah diperlakukan dengan enzim proteolitik diperlakukan dengan enzim proteolitik seperti pepsin, tripsin, α -kimotripsin, pronase E dan proteinase

K. Lebih lanjut Cintas (1995) mengemukakan bahwa pediocin L50 yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* L50 sensitif terhadap tripsin, papain, pepsin, protease II, protease VI, protease XIV namun perlakuan dengan enzim lipolitik atau amilolitik tidak berpengaruh terhadap aktivitas bakteriosin. Dengan demikian terbukti bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan merupakan protein (bakteriosin).

3. Stabilitas bakteriosin terhadap pH dan suhu.

Stabilitas bakteriosin terhadap berbagai pengaruh pH perlu diketahui untuk melihat seberapa jauh potensinya bila diaplikasikan terhadap bahan pangan. Stabilitas bakteriosin terhadap kisaran pH yang luas sangat diharapkan, karena dapat digunakan sebagai pengawet bahan pangan yang bersifat asam maupun basa. Hasil perlakuan dengan beberapa pH menunjukkan bahwa bakteriosin masih memiliki aktivitas antibakteri sampai pada pH 10 (Tabel 8). Bahkan dengan perlakuan suhu 100° C bakteriosin masih menunjukkan aktivitas antibakteri sampai pada pH 10. Bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BR-8 merupakan bakteriosin yang stabil pada pemanasan 100° C baik dalam kondisi asam maupun basa.

Tabel 8. Hasil uji stabilitas bakteriosin terhadap pengaruh pH dan suhu

Perlakuan pH	Aktivitas Antibakteri		
	2 jam, 25° C	24 jam, 25° C	20 menit, 100° C
2	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
10	+	-	+
12	+	-	-

+, terdapat aktivitas antibakteri

-, tidak terdapat aktivitas antibakteri

Bhunia *et al* (1987) mengemukakan bahwa bakteriosin memiliki beberapa sifat unik yaitu tetap aktif pada kondisi asam dan basa serta tetap stabil terhadap perlakuan suhu rendah maupun suhu tinggi, sehingga hal ini sangat menguntungkan bila dimanfaatkan sebagai biopreservasi untuk memperpanjang masa simpan makanan kaleng dan juga bahan pangan yang disimpan dalam suhu dingin. Lebih lanjut Kojic, *et al.* (1991) mengemukakan bahwa bakteriosin S50 yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* subsp S50 tetap stabil pada kisaran pH 2 - 11. Hasil penelitian Cintas (1995) menunjukkan bahwa pediocin L50 memiliki stabilitas antara pH 2 - 11, sehingga pediocin L50 memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan pengawet pada bahan pangan yang bersifat asam maupun basa.

4. Berat molekul bakteriosin

Hasil pemurnian bakteriosin dengan menggunakan kromatografi penukar anion selanjutnya dianalisis menggunakan SDS-PAGE. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa terdapat 2 pita protein dengan berat molekul masing-masing 20,7 kDa dan 9,8 kDa (Gambar 6). Uji aktivitas antibakteri menunjukkan hasil bahwa aktivitas antibakteri muncul pada pita protein yang (Gambar 6).



Gambar 6A. Hasil elektroforesis SDS-PAGE dengan pewarnaan Coomassie blue (1) Marker (2) Bakteriosin hasil purifikasi dengan kromatografi penukar anion *DEAE-cellulose*

Gambar 6B. Hasil elektroforesis SDSPAGE yang menunjukkan zona penghambatan terhadap bakteri indikator *Pediococcus acidilactici* LR 42

Pita protein dengan berat molekul 20,7 kDa tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Pediococcus acidilactici* LB 42. Dapat dikatakan bahwa bakteriosin hanya dihasilkan oleh pita protein yang memiliki berat molekul 9,8 kDa.

Bakteriosin yang dihasilkan pada penelitian ini dapat diklasifikasikan sebagai bakteriosin kelas II yang memiliki berat molekul rendah. Hal ini sesuai dengan pembagian Klaenhammer (1992) bahwa bakteriosin kelas II merupakan peptida kecil kurang dari 10 kDa, dengan beberapa karakter diantaranya stabil terhadap panas.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Dari 21 isolat BAL yang diduga sebagai penghasil bakteriosin ternyata hanya 12 isolat BAL yang menunjukkan hasil positif sebagai penghasil bakteriosin.
2. Dari 12 isolat BAL yang diketahui sebagai penghasil bakteriosin, maka isolat BR-8 merupakan isolat yang memiliki aktivitas tertinggi terhadap *Pediococcus acidilactici* LB 42 yaitu sebesar 18.000 AU/ml.
3. Hasil purifikasi bakteriosin yang diperoleh menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik sebesar 136 kali.
4. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa bakteriosin memiliki BM sebesar 9,8 kDa, stabil terhadap pengaruh suhu 100⁰ C dan 121⁰ C selama 15 menit, stabil terhadap pengaruh pH 2-10, sensitif terhadap beberapa enzim proteolitik seperti ficin, papain, protease type XIV, protease type XXIV,

5.2 Saran

Perlu dilakukan uji spektrum penghambatan terhadap bakteri lain serta dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan kemurnian bakteriosin dengan menggunakan kromatografi gel filtrasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Boar, N., Harris, N.D. and Rill R.L. 1987. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus* J. Food Sci. 52:411-415.
- Abee T., Klaenhammer, T.R. and Letellier, L. 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl. Environ. Microbiol. 60: 10061013.
- Andrew, A.T. 1988. Electrophoresis: Theory, techniques and biochemical and clinical applications. Butler and Tanner Ltd., Great Britain.
- Atrih, A., Rekluf, N., Milliere, J.B, and Lefebvre, G. 1993. Detection and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. J. Microbiol. 39 1173-1179
- Anonim. 1983. Ion exchange chromatography, principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals
- Axclsson, L. T. 1993. Lactid acid bacteria: Classification and physiology. Daiam Seppo Salminen and Atte von Wright (eds): Lactid Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc. New York. USA.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.K. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bactenocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26:328-334.
- Barefoot, S.F., Ying-Ru Chen, Hughes, T.A., Bodine, A.B., Shearer, M.Y. and Nudges, M.D. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. App. Environ. Microbiol. 60:3522-3528
- Bhunia, A. K, Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Indust. Microbiol., 2:3 19-322.
- Bhunia, A. K. Johnson. M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol, 65: 261-268.
- Bhunia, A. K., Johnson; M.C., Ray. B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of

- action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70:25-30
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M.C. and Kay, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1265-1267.
- Bukhtiyarova, M., Yang, P. and Ray, B. 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid SA/iB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3405-3408.
- Cintas M. L., Rodríguez, J.M. Fernández, M.F., Knutsen, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H. 1995. Isolation and characterization of Pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2643-2648.
- Davey, G. P. and Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:84-89.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C. 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3450-3455.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E. and Lemieux, L. 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77:662-688.
- Einarsson and Lauzon, H.L. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669-676.
- Elegado, F. B., Kim, W.J. and Kwon, D.Y. 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin Ac-1d, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.* 37:1-11.
- Gonzales, C. F. and Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2534-2538.
- Hames, B. D. and Rickwood, D. 1990. Gel Electrophoresis of proteins. Oxford University Press. Oxford, New York.

- Harris, E.L.V. and Angal, S. 1994. Protein purification methods: A practical approach. Oxford University Press. Oxford, New York.
- Holla, S., 1990. Efficiency of Pediocin AcH on viability loss of pathogenic and spoilage bacteria in food. Dalam Ray, B. dan Daeschel, M.(eds). Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press, Inc.
- Hoover, D. G. and Harlander, S.K. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. Dalam Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Eds): Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Academic Press. USA.
- Hynes, W. L. Ferreti, J.J. and Tagg, J.R 1993. Cloning of the gene encoding Streptococcin A-FF22 a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyrogenes*, and determination of its nucleotide sequence. Appl. Environ. Microbiol. 59:1969-1971.
- Sack, R. W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59:171-244.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H. and Warner, P.J. 1995. Purification and Partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPC014, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. Appl. Environ. Microbiol. 61:4459-4463.
- Kalchayanand, N. 1990. Extension of shelf life of vacuum packaged refrigerated fresh beef by bacteriocin of lactic acid bacteria. Ph.D Thesis, University of Wyoming, Laramie.
- Kanatani, K. and Oshimura, M. 1994. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus plantarum* strain. Biosci. Biotech. Biochem, 58:2084-2086.
- Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus* Appl. Environ. Microbiol. 61:1061-1067.
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S.K. and Itoh, T. 1994. Isolation and characterization of highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasser*. LA39. Biosci. Biotech. Biochem. 58:1218-1221.
- Kim, W. J., Hong, S. S., Cha, S.K. and Koo, Y. J. 1993. Use of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* in sausage fermentation. J. Microbiol. Biotech. 3: 199-203.

- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochem.* 70:337-349.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria FEMS. *Microbial. Review.* 12:39-89.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbial.* 57:1835-1837.
- Lehninger, A.L. 1982 Principles of biochemistry. Worth Publishers, Inc.
- Lewes, C. B., Sun, S. and Montville, T.J. 1992. Production of amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:143-149.
- Me. Auliffe, Ryan, M.P., Ross, R.P., Hill, C., Breeuwer, P. and Abbe, A. 1998. Lacticin 3147, a broad spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbial.* 64: 439-445.
- Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., and Nes, I.F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbial.* 57:1829-1834.
- Mortvedt-Abildgaard. C. I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. and Nes, I.F. 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbial.* 61:175179.
- Moll, G. N., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. 1996. Mechanism of raisin-induced pore-formation. Dalam Bozoglu, T.F, and Ray, B. (eds): Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications. NATO'ASI series. Germany.
- Muriana. P. M. and Luchansky. J.B. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins. Dalam Hoover. D.G. and Steenson, L.R (eds). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. Inc. USA.
- Nielsen J. W., Dickson. J.S. and Crouse, J.D. 1990. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbial.* 58:143-149.
- Ray, B. 1992. Cells of lactic acid bacteria as food biopreservatives. Dalam Ray, B. dan Daeschel, M. (eds). Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press, Inc.



- Ray, B., Motlagh, A., Johnson, M.C. and Bozoglu, F. 1992. Mapping of pSA4B74, a plasmid-encoding bacteriocin, pediocin AcH, production (Pap+) by *Pediococcus acidilactici* H Appl. Microbiol. 15:35-37.
- Ray, B. 1996. Proteriatrics of lactic acid bacteria: Science or Myth?. Dalam Bozoglu, T.F. and Ray, B. (eds) · Lactid acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications. Springer,, Germany.
- Rahayu, E S dan Margino, S. 1997. Bakteri asam laktat: Isolasi dan Identifikasi. ilateri Workshop, diselenggarakan di PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 13-14 Juni 1997.
- Kahayu, E. S., Djaafar, F.F., Wibowo, D. and Sudarnadji, S.1996. Lactid acid bacteria from indigenous fenuented foods and their antimicrobial activity. Indonesian Food and Nutrition Progress. Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Rahayu, E. S., Djaafar, T.F., Wibowo, D. and Sudannadji, S.1996. Lactid acid bacteria from indigenous fenuented foods and their antimicrobial activity. Indonesian Food and Nutrition Progress. Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Rahayu, E.S., Widowati, T.W. and Margino, S. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in refrigerated milk product by antibacteria of *Lactobacillus plantarum* TGR-2. Dalam S. Rahardjo, D.W. Marseno, W. Supartono (eds):Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi, Yogyakarta, 15 Desember 1998.
- Rince, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D. Bourgeois, C.M. and Le Penneec, J.P. 1994. Cloning, Expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bactenocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Ivlicrobiol. 60:1652-1657.
- Roman and Regnier. F.E. 1990. High performance liquid chromatography: Effective protein purification by various chromatographic modes. Dalam Deutcser , M.P. (ed): Guide to protein purification. Academic Press. USA.
- Rossomando, E.F. 1990. Ion-exchange chromatography. Dalam Deutcser, M.P. (ed): Guide to protein purification. Academic Press. USA.
- Ryan M. P., Rea, M.C., Hill, C, and Ross, RP. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin, Lacticin 3147.App1. Environ. Microbiol. 62:612-619.
- Ryan M. P., Meaney, W.J., Ross, R.P. and Hill, C. 1998. Evaluation of Lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis

- pathogens. *Appl Environ. Microbiol.* 64:2287-2290.
- Sasha and Seifter. 1990. Precipitation techniques. Dalam Deuteser, M.P. (ed): Guide to protein purification. Academic Press. USA.
- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. and Juven, B.J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-I, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* *J. Appl. Bacteriol.* 74:67-77.
- Stellwagen, E.. 1990. Gel filtration. Dalam Murray P. Deutscher (ed): Guide to protein purification. Academic Press, USA
- Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Hølo, Hand Nes, I.F. 1992. Purification and characterization of new bacteriocin isolated from *Carnobacterium sp* *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1417-1422.
- Stamen, 3. R., 1979. The lactic acid bacteria Microbes of diversity. *Food Technology.* 1:60-65
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. 1984. Prosedur analisa untuk bahan makanan dan pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Tahara T., Oshimora, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. 1996. Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl Environ. Microbiol.* 62:892-897.
- Tanaka, N., Traisman, E., Plantings, P., Finn, I., Flom, W., Meske. I, and Cuggisberg. 1986. Evaluation of factor involved in antibotulinal properties of pasteurized processed cheese spreads *J. Food Prot.* 49:526.
- Tanaka, O., Kimura, H., Takahashi, E., Ogata, S. and Ohmomo, S. 1994. Screening of lactic acid bacteria for silage inoculants by using a model system of silage fermentation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1412-1415.
- Van't Hul and Gibson, W.R 1996. Concentration and recovery of the bacteriocin nisin from *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Biotech. Appl. Biochem.* 24:251-256.
- Wendt, L. 1970. Mechanism of colicin action *J. Bacteriol.* 104: 12361241.
- Yang R, Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3355-3359.

Curriculum Vitae

Nama : Dr. Agustin Krisna Wardani. STP. MSi
Tempat, tanggal lahir : Nganjuk, 7 Agustus 1969
NIP : 132 158 728
Jabatan/Golongan : Asisten Ahli/ 111-a
Pekerjaan : Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian
Unihraw Malang

Pendidikan

1. Doctor of Engineering, Grad. School of Engineering, Dept. of Biotechnology, Osaka University, Japan. 2006.
2. Magister Sains, PAU Bioteknologi, UGM Yogyakarta. 1999
3. Sarjana Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Unibraw Malang. 1993.

Bidang Keahlian : *Metabolic Engineering*, Mikrobiologi & Bioteknologi.

Publikasi Ilmiah

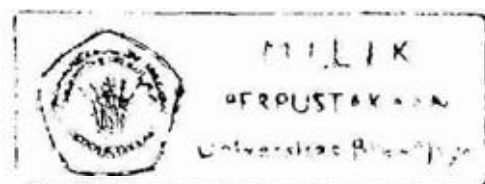
1. **Wardani, A.K., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H and Shioya, S.** 2006. Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. Biochem. Eng. J. **28**: 220-230.
2. **Wardani, A.K., Egawa, S., Nagahisa, K., Shimizu, H and Shioya, S.** 2006. Robustness of cascade pH and dissolve oxygen control in symbiotic nisin production process system of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus* J Biosci. Bioeng. **101**: 274-276.
3. **Wardani, A.K., Nagahisa, K., Shimizu, H. and Shioya, S.** 2007. Reduction of lactate production in *Lactococcus lactis*, a combined strategy: metabolic engineering by introducing the foreign alanine dehydrogenase gene and hemin addition.-world J. of Microbiol. Biotechnol. **23**: 947-953.
4. **Nagayasu, M., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Shimizu, H and Shioya, S.** 2007. Analysis of lactate reduction by hemin addition in *Lactococcus lactis*. J. Biosci. Bioeng. **106**: 529-534.

Agustin Krisna Wardani
NIP 132 158 728

CURRICULUM VITAE

1. Nama Lengkap : Indria Purwantiningrum, S.TP, M Si
2. Tempat/ Tanggal lahir : Malang. 17 Oktober 1979
3. Jenis Kelamin : Perempuan
4. Alamat : Jl Yupiter 27 Malang
5. Telp /HP : 0341-582109/ 08159517904
6. Fakultas/Jurusan : Teknologi Pertanian/Teknologi Hasil Pertanian
7. Pangkat/Golongan/NIP : Asisten Ahli/ IIIa/ 132 310 454
8. Bidang Keahlian : Manajemen Industri Pangan
9. Pengalaman Mengajar :
 - o Mata Kuliah Pengawasan Mutu
 - o Mata Kuliah Sistem Manajemen Mutu
 - o Mata Kuliah Sanitasi dan Keamanan Pangan
10. Penelitian :
 - Pengembangan Model Generik HACCP untuk Industri Pembekuan Udang, Skripsi—FTP Unibraw 2001
 - Penerapan Quality Function Deployment pada Pengembangan Produk Extruded Snack, Tesis –PS. Ilmu Pangan Sekolah Pascasarjana IPB 2007
 - Penyusunan Model Kepuasan Pelanggan Kano Untuk Identifikasi Harapan Pelanggan Pada Pmduk *Extruded Snack*, Laporan PNBFP FTP Unibraw 2007

Indria Purwantiningrum, STP., MSi
NIP. 132 310 454



CURRICULUM VITAE

Nama : Novita Wijayanti, STP.
Tempat/ tanggal Lahir : Jember, 22 November 1980
Jenis Kelamin : Perempuan
NIP : 132311 774
Golongan/Pangkat : IIIa / Penata Muda
Jabatan : Asisten Ahli
Fakultas/Jurusan : Teknologi Pertanian / Teknologi Hasil Pertanian
Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya

Pengalaman Pendidikan:

No.	Tahun	Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	1999-2004	Teknologi Hasil Pertanian	Universitas Brawijaya

Pengalaman Penelitian:

No.	Judul	Tahun
1.	Karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim protease dari <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NKRL H-14396	2004
2.	Aktivitas antibakteri dan antioksidan serbuk ekstrak sambiloto (Kajian jenis dan konsentrasi bahan pengisi)	2006

Novita Wijayanti, STP

NIP 132311 774

CURRICULUM VITAE

- 1 Nama Lengkap : **Wenny Bekti Sunarharum**
- 2 Gelar : **STP. M.Food.St.**
- 3 Tempat dan Tanggal Lahir : **Malang, 05 April 1982**
- 4 Jenis Kelamin : **Perempuan**
- 5 Agama : **Islam**
- 6 Pangkat/Gol. Terakhir : **Penata Muda **1111a****
- 7 Jabatan Akademik / fungsional : **Asisten Ahli**
Pada Program Studi : **Teknologi Hasil Pertanian**
Jurusan : **Teknologi Hasil Pertanian**
Fakultas : **Teknologi Pertanian**
- 8 Jabatan struktural saat ini : **-**
- 9 Alamat Kantor : **Jl. Veteran – Malang**
Telepon : **569 214 / 57 33 58**
E-mail : **wennybbx@yahoo.com**
Alamat Kumah : **JL. Candi Panggung Permai 32 Malang**
Telepon : **0341-9058537**
HP : **081314676764**
E-mail : **wennybs@yahoo.com**

PENELITIAN YANG PERNAH DILAKUKAN

1. Studi karakteristik tahu yang diproduksi oleh beberapa industri tahu di Kecamatan Turen, Kabupaten Malang
2. Identification of key volatiles responsible for the unique aromas and flavours of different mango

PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

1. Penyuluhan Produk Olahan Nangka di Pesanggrahan Batu
2. Penyuluhan Keamanan Pangan di radio, beberapa SD dan PKK di Kota Malang

Wenny Bekfi Sunarharum, STP, M.Food.St