

# ISOLASI, SELEKSI, KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL BAKTERIOSIN DARI BERBAGAI BUAH MASAK

*Isolation, Selection, characterisation and Identification of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from some Ripe Fruits*

Sarkono<sup>1</sup>, Langkah Sembiring<sup>2</sup> dan Endang S. Rahayu<sup>3</sup>

Program Studi Biologi  
Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

## ABSTRACT

Fruits are indicates as a habitat of lactic acid bacteria (LAB) because their chemical composition and micro environment which needed to their life. The aim of this research was to study the diversity of lactic acid bacteria on some ripe fruits, to obtain lactic acid bacterial isolate which capable to produce bacteriocin, to know their phenotypic characteristic, classify an identify the isolates phenetically. Lactic acid bacteria were isolated from papaya, banana, pineapple and salak by using pour plate method and then purified by using streak plate method. All isolates were screened their potency to onhibit the growth of some pathogenic bacteria. The capacity to produce bacteriocin were determined by heating the cultural medium at 100°C up to 60 minutes and treating with the proteolytic enzyme (Proteinase K) at room temperature.

The result of this experiment indicated that cultural medium from twelve isolates able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. the best two of isolates (PE6 and PE9) also active to some pathogenic bacteria such as *Eschericia coli* FNCC 0091, *Bacillus cereus* FNCC 0057 and *Salmonellla tiphymurium* FNCC 0050. the inhibitory compounds produce by the isolates

<sup>1</sup> Fakultas Biologi Universitas Mataram, Mataram

<sup>2</sup> Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup> Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PE6 was found to be heat stable at 100°C for 60 minutes. However the activity was decrease after treatment with proteolytic enzyme. Therefore the substances was indicated to be bacteriocin. Five representative isolates was chosen for further study for identification. Based on their phenotypic characters analysis, the isolate PE6 was identified to be the member of species *Lactobacillus acidophilus*, isolate PE9 and PI3 were identified to be the member of species *Pediococcus acidilactici*, while isolate NA4 and PI1 were identified to be the member of species *Pediococcus pentosaceus*.

**Keywords :** *Lactic acid bacteria (LAB), bacteriocin, staphylococcus aureus FNCC 0047*

## PENGANTAR

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri gram positif yang disatukan oleh beberapa karakter seperti karakter morfologis, metabolisme dan fisiologis. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk kokus atau batang, serta menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utamanya pada fermentasi karbohidrat (Axelsson, 1998).

Bakteri asam laktat sering ditemukan secara alamiah dalam bahan makanan. Bakteri ini hidup pada susu, daging, buah-buahan, sayur-sayuran dan pada makanan hasil fermentasi. Dalam proses fermentasi secara spontan khususnya fermentasi asinan, bakteri asam laktat ditemukan sebagai mikrobiota dominan yang dapat menghambat bakteri pembusuk dan bakteri patogen (Djaafar, 1996). Aktivitasnya yang menghambat bakteri pembusuk dan bakteri patogen ini berkaitan dengan dihasilkannya asam-asam organik (asam laktat, asam asetat, asam format), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin yang dihasilkan (Daeschel, 1989).

Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan komponen-komponen antimikrobia menyebabkan bakteri asam laktat dapat dikembangkan sebagai agensia pengawet makanan baik sebagai kultur starter maupun dalam bentuk metabolit ekstraselularnya seperti bakteriosin (Yang & Ray, 1993). Penggunaan bakteri asam laktat sebagai kultur starter telah lama dimanfaatkan dalam proses fermentasi berbagai bahan makanan, seperti pada pembuatan *yoghurt*, keju, fermentasi daging, fermentasi buah-buahan dan fermentasi

sayur-sayuran. Sedangkan agensia pengawet makanan dalam bentuk bakteriosin yang sudah dikembangkan dan banyak digunakan adalah *nisin*.

Penelitian mengenai isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil agensia pengawet hayati potensial telah banyak dilakukan pada berbagai bahan pangan misalnya daging dan olahannya (Rahayu et al., 2004), makanan fermentasi (Djaafar et al., 1996), ikan dan produk ikan (Danil & Lelly, 2000) dan lain-lain. Namun demikian penelitian bakteri asam laktat yang bersumber dari buah-buahan belum banyak ditemukan. Padahal diduga buah-buahan merupakan sumber bakteri asam laktat yang potensial terutama karena kandungan karbohidrat sederhana dan asam organiknya yang tinggi. Jenis gula yang dominan pada buah tergantung pada jenis buahnya tetapi pada umumnya terdiri atas sukrosa, fruktosa dan glukosa, sedangkan jenis asam organik yang dominan terdapat pada buah-buahan adalah asam sitrat dan asam malat.

Pada penelitian ini ingin didapatkan isolat bakteri asam laktat dari berbagai jenis buah yaitu pepaya, nanas, pisang dan salak. Selanjutnya juga ingin diketahui kemampuan isolat-isolat bakteri asam laktat tersebut dalam memproduksi bakteriosin karena banyak diantara strain bakteri asam laktat dari berbagai habitat terbukti mampu menghasilkan bakteriosin.

## CARA PENELITIAN

### 1. Sampel buah

Sampel berupa buah pepaya, nanas, pisang dan salak diambil langsung dari pohon di daerah Pakem, Kabupaten Sleman Yogyakarta. Dipilih buah yang benar-benar sudah masak pohon, kemudian masing-masing diambil satu buah untuk pepaya dan nanas, satu sisir untuk pisang dan satu tandan untuk salak, lalu dimasukkan dalam kemasan plastik yang sebelumnya sudah disterilisasi untuk dibawa ke laboratorium.

### 2. Isolasi Selektif Bakteri Asam Laktat (BAL)

Isolasi selektif bakteri asam laktat dari buah masak dilakukan dengan metode *enrichment* dilanjutkan dengan *pour plate*. Sampel buah sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam 5 jenis media selektif untuk bakteri asam laktat yaitu media TGE

(Tryptone Glucose yeast Extract) pH 5,0 plus 3% NaCl; media MRS pH 5,5; media TGE pH 5,5; media TGE buffer dan media TGE tanpa tween 80 plus 0,1% Na-azida yang masing-masing ditambah dengan kalsium karbonat 1%. Selanjutnya diinkubasi selama 2-3 hari.

Dari masing-masing jenis media dilakukan seri pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-7}$ , kemudian dari pengenceran  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  masing-masing diambil 1 ml dan dituang ke dalam cawan petri lalu dituangi media TGE padat +  $\text{CaCO}_3$  1% dan diratakan. Diinkubasi pada  $30^\circ\text{C}$  selama 2-3 hari. Koloni Bakteri Asam Laktat pada masing-masing jenis media dikenali dengan munculnya zona jernih di sekeliling koloni. Masing-masing koloni yang memiliki kenampakan berbeda diisolasi dan dilakukan pemurnian dengan metode goresan (*streak plate*) pada media MRS agar hingga diperoleh isolat yang murni (Djaafar *et al.*, 1996). Isolat murni diidentifikasi sebagai bakteri asam laktat bila isolat tersebut menunjukkan karakter gram positif, katalase negatif, non motil dan tidak membentuk spora. Kemudian isolat murni disimpan dalam gliserol 10% pada suhu  $-80^\circ\text{C}$  sebagai kultur stok.

### 3. Seleksi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin

Isolat-isolat yang telah disimpan sebagai kultur stok selanjutnya diseleksi kemampuannya menghasilkan bakteriosin dengan beberapa tahapan metode uji yaitu uji kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, uji spektrum aktivitas antimikrobia dengan menggunakan 4 jenis bakteri patogen dan uji konfirmasi terhadap antimikrobia yang dihasilkan untuk memastikan apakah antimikrobia yang dihasilkan dapat diduga sebagai bakteriosin.

#### Uji kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Isolat yang diperlakukan dalam bentuk supernatan yang berisi metabolit ekstraselular. Metabolit ekstraselular diperoleh dengan cara menginokulasi kultur cair isolat bakteri asam laktat sebanyak 2% ke dalam media cair Tryptone Glucose Yeast Extract (pH 6,5) kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 96 jam (Bar *et al.*, 1987). Setelah inkubasi dilakukan pengukuran pH, kemudian pH dinetralkan menjadi 6,5 dengan NaOH. Selanjutnya kultur cair disentrifugasi

menggunakan sentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh disterilisasi dengan filter bakteri (diameter porous  $0,2 \mu\text{m}$ , whatman) sehingga diperoleh metabolit ekstraseluler steril.

**Metode Difusi Kertas (Disk Assay).** Sebanyak 10 ml media Nutrient Agar steril pada suhu  $40-45^\circ\text{C}$  diinokulasi dengan 0,2% biakan *S. aureus* FNCC 0047 yang berumur 18-24 jam. Kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah padat, diletakkan kertas saring (Whatman 42) steril berukuran 10 mm pada permukaan agar, kemudian diteteskan supernatan sebanyak 50  $\mu\text{l}$ , dibiarkan selama  $\pm 1$  jam pada suhu kamar dan diinkubasikan pada  $30^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Penghambatan pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047 diukur dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar kertas saring.

**Metode Difusi Sumuran (Well Difusion).** Uji ini dilakukan dengan penanaman bakteri uji *S. aureus* FNCC 0047 pada media Nutrien Agar keras yang sudah memadat, selanjutnya ditambah media Nutrien Agar lunak di atasnya. Setelah didinginkan selama 1 jam dalam kamar pendingin diberi sumuran dengan diameter 0,5 mm dan dimasukkan supernatan isolat bakteri asam laktat sebanyak 50  $\mu\text{l}$ , didinginkan kembali selama 1 jam dan kemudian diinkubasikan pada  $30^\circ\text{C}$  selama 24 - 48 jam. Masing-masing isolat yang terdapat zona jernih diukur diameternya (Djaafar, 1996).

**Metode Kekeruhan (Turbidimetric Assay).** Supernatan steril dari isolat bakteri asam laktat dicampur dengan media Nutrien Broth (NB) *double strength* (konsentrasi dua kali) dengan volume yang sama (v:v = 1:1), kemudian diberi biakan *S. aureus* FNCC 0047 umur 18-24 jam sebanyak 1%. Selanjutnya diinkubasikan pada  $30^\circ\text{C}$ . Absorbansi  $\lambda$  600 nm diukur setiap jam selama 12 jam pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer. Kontrol berupa media NB *single strength* yang diinokulasi dengan biakan *S. aureus* FNCC 0047 sebanyak 1% tanpa penambahan supernatan. Penghambatan pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047 diukur dengan melihat adanya perpanjangan fase lag dari sel yang diberi supernatan (Djaafar *et al.*, 1996).

#### Uji Spektrum Aktivitas Antimikrobia

Isolat bakteri asam laktat yang mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi terhadap *S. aureus* FNCC 0047 pada uji sebelumnya, selanjutnya diuji aktivitas penghambatannya terhadap beberapa bakteri patogen yakni: *Eschericia coli* FNCC 0091, *Bacillus*

*cereus* FNCC 0057, *Salmonella tiphymurium* FNCC 0050 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dengan metode *turbidimetric assay*. Untuk melihat spektrum aktivitas antibakteri digunakan supernatan yang telah dipekatkan 5 kalinya. Caranya yaitu, supernatan dikeringbekukan dengan *friez dryer* kemudian dilarutkan dalam akuades steril hingga volume menjadi 1/5 volume awal. Selanjutnya disaring dengan filter bakteri hingga didapatkan supernatan pekat yang steril.

#### Uji konfirmasi terhadap antimikrobia yang dihasilkan

Uji konfirmasi terhadap zat antimikrobia yang dihasilkan adalah uji stabilitas terhadap perlakuan suhu tinggi dan enzim proteolitik. Diperkirakan bahwa bakteriosin yang berupa peptida, stabil terhadap panas tetapi tidak stabil terhadap aktivitas enzim proteolitik.

Uji stabilitas terhadap suhu tinggi dilakukan dengan memanaskan 'supernatan' pada (a) suhu 100°C selama 5 menit (sebagai kontrol), (b) suhu 100°C selama 15 menit, (c) suhu 100°C selama 30 menit dan (d) suhu 100°C selama 60 menit. Supernatan selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya menggunakan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dengan metode turbidimetri.

Uji stabilitas terhadap enzim proteolitik dilakukan dengan cara melarutkan enzim proteolitik (proteinase K) dalam 4 mM bufer fosfat pH 7,0 pada konsentrasi 10 µg/ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 1 jam. Setelah selesai inkubasi kemudian diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan 'supernatan' tanpa perlakuan enzim proteolitik sebagai kontrol, menggunakan metode turbidimetri (Rahayu *et al.*, 2004).

#### 4. Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat Terpilih

Berdasarkan hasil seleksi kemudian dipilih 5 isolat bakteri asam laktat yang merepresentasikan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047 dan asal isolat.

#### Karakterisasi berdasar sifat fenotipik

Karakter isolat yang diuji meliputi tiga kelompok yaitu morfologi sel, karakter biokimiawi dan karakter fisiologis. Kelompok karakter morfologi sel meliputi 6 unit karakter yaitu bentuk sel,

endospora. Kelompok karakter biokimiawi meliputi 43 unit karakter yaitu uji tipe isomer peptidoglikan, katalase, tipe fermentasi karbohidrat, pembentukan asam dari 20 macam sumber karbon (karbohidrat) dan pembentukan gas dari 20 macam sumber karbon (karbohidrat). Sedangkan kelompok karakter fisiologis meliputi 18 unit karakter yaitu uji pengaruh suhu terhadap pertumbuhan isolat BAL (suhu 4,10, 15, 20, 40, 45 dan 50°C), uji pengaruh pH (pH 3.5, 4.0, 4.5, 8.0, 8.5, 9.0 dan 9.6) dan uji pengaruh kadar NaCl (NaCl 5%, 6.5%, 10% dan 18%). Sehingga secara keseluruhan ada 67 unit karakter.

#### Identifikasi berdasarkan karakter fenotipik

Isolat bakteri asam laktat potensial yang telah dikarakterisasi selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter fenotipiknya dengan metode *Profile Matching* menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Selektif BAL dari Buah Masak

Tahap isolasi selektif BAL dari sampel buah pepaya, nanas, pisang dan salak menghasilkan 26 isolat yang menunjukkan ciri-ciri Bakteri Asam Laktat.

Isolasi bakteri asam laktat dari buah masak dilakukan melalui tahap pengkayaan (*enrichment*) untuk memperbanyak jumlah bakteri asam laktat yang dikehendaki pada sampel. Dalam tahap ini digunakan lima jenis media selektif yang dimodifikasi untuk merangsang bakteri asam laktat jenis tertentu. Menurut Rahayu *et al.* (2004), tujuan digunakannya 5 jenis media yang berbeda adalah untuk menstimulasi pertumbuhan masing-masing anggota genus bakteri asam laktat. Untuk mendapatkan BAL anggota genus *Pediococcus* digunakan media TGE pH 5,0 ditambah 3% NaCl, inkubasi dilakukan pada suhu 45°C. Untuk memperoleh anggota genus *Lactobacillus* digunakan media MRS pH 5,5 inkubasi pada suhu 25-30°C. Untuk memperoleh anggota genus *Leuconostoc* digunakan media TGE pH 5,5 inkubasi pada suhu rendah (5-10°C). Untuk mendapatkan anggota genus *Lactococcus* digunakan media TGE buffer yaitu TGE tanpa tween 80 tetapi ditambah 0,2% Na-sitrat, 0,2% Na-asetat, 0,2% Na-fosfat, pH 5,5, inkubasi dilakukan pada 25°C. Untuk memperoleh anggota genus *Enterococcus* digunakan media TGE tanpa tween 80 ditambah 0,1% Na-asetat, pH 6,0 inkubasi pada suhu 40°C.

Tabel 1. Isolat Bakteri Asam Laktat yang didapatkan dari empat macam buah masak

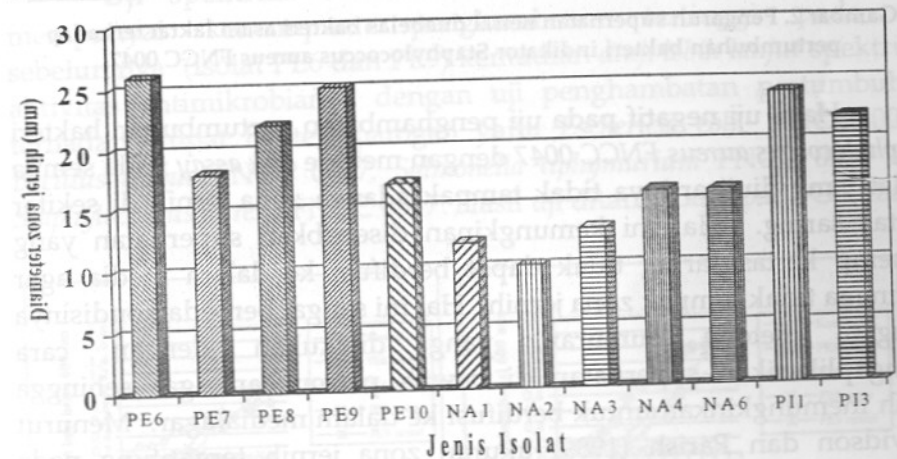
Kode Isolat	Sumber isolat	Karakteristik penciri Bakteri Asam Laktat			
		Sifat Gram	Katalase	Endospora	Bentuk sel
PE1	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PE2	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PE3	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Batang
PE4	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Batang
PE6	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Batang
PE7	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PE8	Pepaya	Positif	Positif	Negatif	Kokus
PE9	Pepaya	Positif	Positif	Negatif	Kokus
PE10	Pepaya	Positif	Positif	Negatif	Batang
PE13	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Batang
PE16	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PE18	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Batang
PE22	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PE29	Pepaya	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
NA1	Nanas	Positif	Positif	Negatif	Batang
NA2	Nanas	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
NA3	Nanas	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
NA4	Nanas	Positif	Positif	Negatif	Batang
NA6	Nanas	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
PI1	Pisang	Positif	Positif	Negatif	Kokus
PI3	Pisang	Positif	Positif	Negatif	Kokus
PI15	Pisang	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
SA1	Salak	Positif	Negatif	Negatif	Batang
SA2	Salak	Positif	Negatif	Negatif	Kokus
SA5	Salak	Positif	Negatif	Negatif	Batang
SA6	Salak	Positif	Negatif	Negatif	Batang

Hasil isolasi menunjukkan bahwa dari buah pepaya didapatkan jumlah isolat bakteri asam laktat terbanyak dan setelah diuji aktivitas antimikrobiana dengan bakteri uji, salah satu di antaranya yaitu PE6 mempunyai aktivitas antimikrobia yang paling baik. Salminen dan Wright (1998) mengatakan bahwa Bakteri asam laktat biasa hidup berasosiasi dengan habitat yang kaya akan nutrisi seperti dalam berbagai produk makanan (susu, daging, minuman sari buah dan sayuran). Ray dan Daeschel (1992), menyatakan bahwa kebanyakan mikroorganisme fermentatif seperti bakteri asam laktat dapat dengan mudah diisolasi dari tanaman. Mikroorganisme ini akan berkembangbiak dengan cepat menjadi populasi yang besar pada vegetasi yang membusuk yang mengandung cukup gula bebas.

Bakteri asam laktat juga merupakan organisme *indigenous* pada permukaan tanaman hidup.

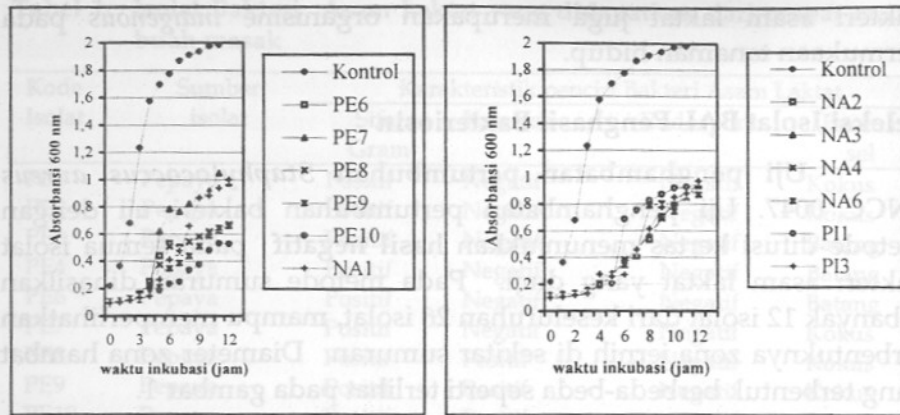
### Seleksi Isolat BAL Penghasil Bakteriosin

Uji penghambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Uji penghambatan pertumbuhan bakteri uji dengan metode difusi kertas menunjukkan hasil **negatif** pada semua isolat bakteri asam laktat yang diuji. Pada metode sumuran dihasilkan sebanyak 12 isolat dari keseluruhan 26 isolat, mampu memperlihatkan terbentuknya zona jernih di sekitar sumuran. Diameter zona hambat yang terbentuk berbeda-beda seperti terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Diameter zona jernih yang dibentuk oleh duabelas isolat bakteri asam laktat dengan metode sumuran.

Isolat-isolat yang mampu menghambat bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 selanjutnya diuji kembali dengan metode turbidimetri. Supernatan dicobakan dalam bentuk supernatan asam dan netral. Hasil uji menunjukkan ada perbedaan daya hambat antara supernatan asam dan netralnya. Supernatan asam bersifat bakteriostatik dan menyebabkan bakteri uji tidak memperlihatkan pertumbuhan, sedangkan supernatan netral hanya berefek memperpanjang fase lag dan menurunkan jumlah populasi bakteri uji (Gambar 2). Secara umum semua isolat dalam bentuk supernatan netral mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dengan kemampuan yang berbeda-beda.



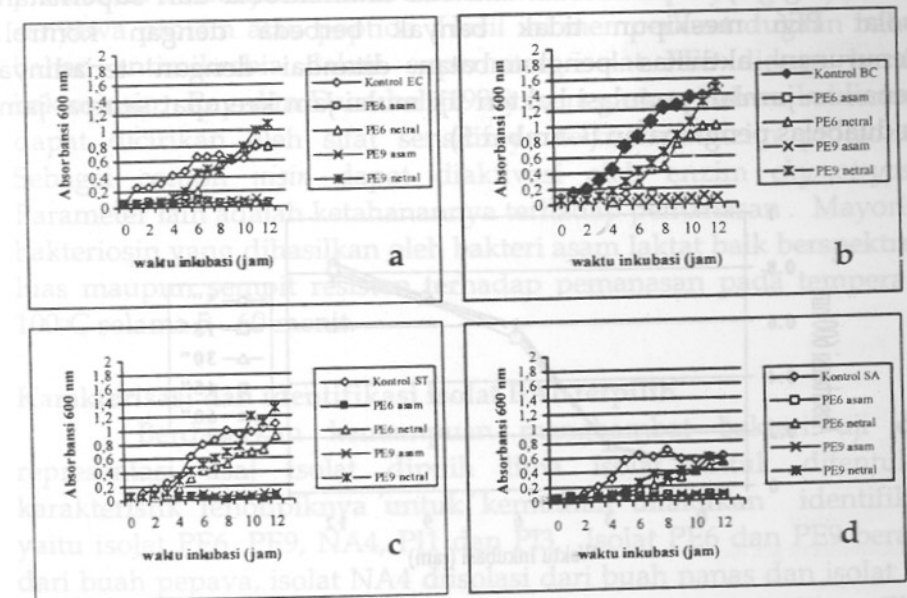
Gambar 2. Pengaruh supernatan netral duabelas bakteri asam laktat terhadap pertumbuhan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Hasil uji negatif pada uji penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dengan metode *disk assay* pada semua isolat yang diuji artinya tidak tampak adanya zona jernih di sekitar kertas saring. Hal ini kemungkinan disebabkan supernatan yang terserap kertas saring tidak dapat berdifusi ke dalam media agar sehingga tidak tampak zona jernih. Hal ini sangat berbeda kondisinya dengan metode sumuran, yang dilakukan dengan cara mengaplikasikan supernatan di bawah permukaan agar sehingga lebih memungkinkan untuk berdifusi ke dalam media agar. Menurut Davidson dan Parish (1989) ukuran zona jernih tergantung pada kecepatan difusi antimikrobia pada media agar dan kecepatan pertumbuhan bakteri uji. Montville dan Kaiser (1993) menyatakan bahwa hasil *screening* untuk mendeteksi isolat *bakteriosinogenik* sangat tergantung pada metode skrining, media, dan organisme yang digunakan sebagai organisme uji aktivitas bakteriosin. Pemilihan organisme uji (*bacteriocin sensitive*) yang digunakan dalam proses *screening* sangat penting, karena setiap organisme uji biasanya mempunyai sensitivitas dan spesifikasi tertentu. Teknik yang ideal adalah apabila organisme uji dalam proses *screening* berasal dari bahan yang akan diawetkan.

Uji penghambatan isolat bakteri terhadap bakteri indikator dengan metode sumuran memperlihatkan hasil positif dengan terbentuknya zona jernih pada 12 isolat dari 26 isolat yang diuji. Keduabelas isolat yang memberikan hasil positif ini selanjutnya diuji kembali dengan metode turbidimetri. Hasil uji turbidimetri menunjukkan hasil positif pada keduabelas isolat. Hal ini ditunjukkan

dengan adanya pemanjangan fase lag dan penurunan jumlah populasi bakteri indikator selama 12 jam pengujian. Djaafar et al. (1996) dalam penelitiannya pernah mengalami kendala yang sama yaitu tidak terbentuknya zona jernih dengan metode *disk assay* dan memberikan hasil yang positif dengan metode *turbidimetric assay*. Metode turbidimetri memberikan hasil uji yang lebih sensitif karena pada uji ini digunakan media cair sehingga supernatan bercampur dengan media dan langsung kontak dengan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Selain itu pada metode turbidimetri konsentrasi supernatan yang digunakan lebih besar yakni sama dengan volume media cair yang digunakan.

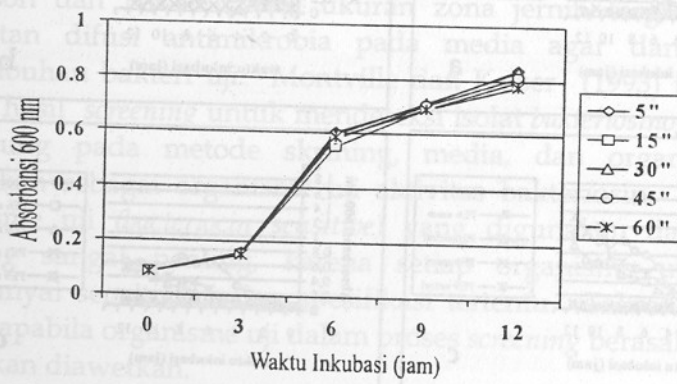
**Uji spektrum aktivitas antimikrobia.** Dua isolat yang mempunyai kemampuan penghambatan tertinggi pada uji sebelumnya (isolat PE6 dan PE9) kemudian diuji lebih lanjut spektrum aktivitas antimikrobiana dengan uji penghambatan pertumbuhan terhadap empat bakteri patogen yaitu *Escherichia coli* FNCC 0091, *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella tiphymurium* FNCC 0050 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Hasil uji ditampilkan pada Gambar 3



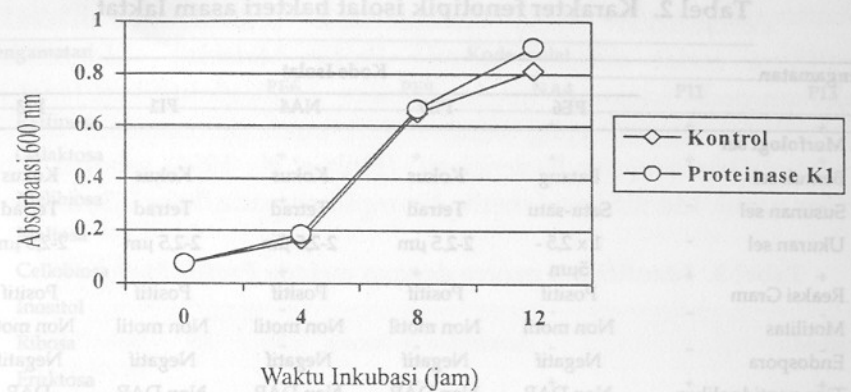
Gambar 3. Uji spektrum aktivitas antimikrobia dari isolat PE6 dan PE9 dengan metode turbidimetri (a) *Escherichia coli* FNCC 0091; (b) *Bacillus cereus* FNCC 0057; (c) *Salmonella tiphymurium* FNCC 0050 dan (d) *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Spektrum aktivitas antimikrobia isolat PE6 dan PE9 tidak jauh berbeda karena sama-sama dapat menghambat pertumbuhan keempat bakteri uji. Akan tetapi isolat PE6 menunjukkan kemampuan yang lebih baik karena menyebabkan penambahan fase lag yang lebih panjang dan penurunan populasi yang lebih besar pada keempat bakteri uji.

Uji konfirmasi terhadap antimikrobia yang dihasilkan. Berdasarkan uji spektrum aktivitas antimikrobia diambil satu isolat yang paling potensial memproduksi antimikrobia (isolat PE6) untuk diuji lebih lanjut dengan uji konfirmasi terhadap antimikrobia yang dihasilkan sehingga dapat diduga antimikrobianya berupa bakteriosin atau berupa bahan aktif yang lain. Dari uji pengaruh pemanasan terhadap aktivitas supernatan didapatkan hasil bahwa dengan pemanasan 100°C selama 15, 30, 45 dan 60 menit aktivitas antimikrobia dari supernatan isolat PE6 masih relatif stabil, ditandai dengan tidak terjadinya lonjakan jumlah populasi bakteri indikator dengan bertambahnya waktu pemanasan (Gambar 4). Sedangkan dengan perlakuan enzim proteolitik (Proteinase K) selama satu jam, cenderung terjadi penurunan aktivitas antimikrobia dari supernatan isolat PE6 meskipun tidak banyak berbeda dengan kontrol. Penurunan aktivitas penghambatan ditandai dengan terjadinya kenaikan jumlah populasi bakteri uji mulai jam keempat sampai jam keduabelas pengamatan (Gambar 5).



Gambar 4. Pengaruh pemanasan pada aktivitas penghambatan supernatan isolat PE6 terhadap pertumbuhan Staphylococcus aureus FNCC 0047



Gambar 5. Pengaruh perlakuan enzim proteolitik (Proteinase K) pada aktivitas penghambatan supernatan isolat PE6 terhadap pertumbuhan Staphylococcus aureus FNCC 0047

Sifat tahan panas dan sensitif terhadap enzim proteolitik merupakan ciri khas bakteriosin. Sifat sensitif terhadap enzim proteolitik menunjukkan bahwa bahan antimikrobia yang diuji berupa senyawa protein atau peptida. Hasil ini memperkuat dugaan bahwa bahan antimikrobia dalam supernatan isolat PE6 diduga berupa bakteriosin. Ray dan Daeschel (1992) menegaskan bahwa bakteriosin dapat dicirikan oleh sifat sensitifnya terhadap enzim proteolitik. Sebagai contoh *nisin* dapat diaktivasi oleh enzim *chymotrypsin*. Parameter lain adalah ketahanannya terhadap pemanasan. Mayoritas bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat baik berspektrum luas maupun sempit resisten terhadap pemanasan pada temperatur 100°C selama 5 - 60 menit.

**Karakterisasi dan identifikasi isolat BAL terpilih**

Berdasarkan kemampuan menghambat bakteri uji dan representasi asal isolat dipilih lima isolat untuk ditentukan karakteristik fenotipiknya untuk kemudian dilakukan identifikasi yaitu isolat PE6, PE9, NA4, PI1 dan PI3. Isolat PE6 dan PE9 berasal dari buah pepaya, isolat NA4 diisolasi dari buah nanas dan isolat PI1 serta PI3 berasal dari buah pisang. Hasil karakterisasi ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakter fenotipik isolat bakteri asam laktat

Pengamatan	Kode Isolat				
	PE6	PE9	NA4	PI1	PI3
<b>A. Morfologi sel</b>					
Bentuk sel	Batang	Kokus	Kokus	Kokus	Kokus
Susunan sel	Satu-satu	Tetrad	Tetrad	Tetrad	Tetrad
Ukuran sel	1 x 2,5 - 5µm	2-2,5 µm	2-2,5 µm	2-2,5 µm	2-2,5 µm
Reaksi Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Motilitas	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil
Endospora	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Tipe peptidoglikan	Non DAP	Non DAP	Non DAP	Non DAP	DAP
<b>B. Karakter biokimiawi</b>					
Katalase	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Tipe fermentasi	Homoferm.	Homoferm.	Homoferm.	Homoferm.	Homoferm.
<b>Pembentukan asam dari:</b>					
Sukrosa	+	-	-	-	-
Mannitol	+	-	-	-	-
Xyloza	+	+	+	+	+
Rhamnosa	+	+	+	+	+
Glukosa	+	-	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	-	+
Raffinosa	-	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	-	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Cellobiosa	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	+	+
Fruktosa	+	-	+	+	+
Melecitosa	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Salicin	+	-	+	+	+
Threhalosa	-	+	+	+	+
<b>Pembentukan gas dari:</b>					
Sukrosa	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Xyloza	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	+	-	-	+
Glukosa	-	+	+	+	+
Laktosa	+	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-

Pengamatan	Kode Isolat				
	PE6	PE9	NA4	PI1	PI3
Raffinosa	-	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	-	-	-	-
Maltosa	+	-	-	-	-
Cellobiosa	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-	-
Fruktosa	-	+	+	+	+
Melecitosa	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Threhalosa	-	-	-	-	-
<b>C. Karakter fisiologis</b>					
<b>Pertumbuhan pada:</b>					
Suhu 4°C	-	-	-	-	-
Suhu 10°C	-	-	-	-	-
Suhu 15°C	+	+	+	+	+
Suhu 20°C	+	+	+	+	+
Suhu 40°C	+	+	+	+	+
Suhu 45°C	+	+	+	+	+
Suhu 50°C	-	+	-	-	+
pH 3,5	+	+	+	+	+
pH 4,0	+	+	+	+	+
pH 4,5	+	+	+	+	+
pH 8,0	+	+	+	+	+
pH 8,5	+	+	+	+	+
pH 9,0	+	+	+	+	+
pH 9,6	-	-	-	-	-
Kadar NaCl 5%	+	+	+	+	+
Kadar NaCl 6,5%	+	+	+	+	+
Kadar NaCl 10%	+	+	+	+	+
Kadar NaCl 18%	-	-	-	-	-



Berdasarkan hasil karakterisasi selanjutnya dilakukan identifikasi isolat dengan metode *Profile Matching*. Identifikasi dilakukan pada tingkat genus dan spesies. Hasil identifikasi fenotipik kelima isolat bakteri yang berasal dari buah berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994) sebagai acuan standar untuk identifikasi fenetik ditampilkan pada Tabel 3, 4, dan 5.

Tabel 3. Identifikasi genera dengan metode *Profile Matching*

Karakteristik	Lactobacillus	Pediococcus	Pe6	Pe9	Na4	PI1	PI3
1. Bentuk sel batang	+	-	+	-	-	-	-
2. Sel sferis, tidak memanjang	-	+	-	+	+	+	+
3. Sel tetrad atau dua-dua	-	+	-	+	+	+	+
4. Sel tidak tunggal, tidak membentuk rantai	-	+	-	+	+	+	+
5. Reaksi gram	+	+	+	+	+	+	+
6. Endospora	-	-	-	-	-	-	-
7. Katalase	-	-	-	-	-	-	-
8. Motilitas	-	-	-	-	-	-	-
9. Produk akhir karbon berupa laktat	+	+	+	+	+	+	+
10. Homofementatif	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 4. Identifikasi spesies pada genus *Pediococcus* dengan metode *Profile Matching*.

Karakteristik	P. Acidilactici	P. Pentosaceus	Pe9	Na4	PI1	PI3
Tumbuh pada:						
35 °C	+	-	+	-	+	+
40 °C	+	-	+	-	+	+
50 °C	+	-	+	-	+	+
Tumbuh pada:						
pH 4,2	+	+	+	-	+	+
pH 7,5	+	+	+	+	+	+
pH 8,5	d	d	+	+	+	+
Tumbuh dalam:						
4 % NaCl	+	+	+	-	+	+
6,5 % NaCl	+	+	+	-	+	+
18 % NaCl	-	-	-	-	-	-

Tabel 5. Identifikasi spesies pada genus *Lactobacillus* dengan metode *Profile Matching*.

Karakteristik	L. Acidophilus	Pe9
Tipe peptidoglikan	non DAP	non DAP
Tumbuh pada 15°C	-	-
Fermentasi KH:		
Sukrosa	+	+
Glukosa	+	+
Laktosa	+	+
Raffinosa	d	-
Galaktosa	+	-
Melibiosa	d	+
Maltosa	+	+
Cellobiosa	+	+
Inositol	nd	-
Fruktosa	+	+
Melecitosa	-	-
Glukonat	-	-
Sorbitol	+	+
Salicin	+	+
Trehalosa	d	-

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa kelima isolat menunjukkan sifat-sifat sebagai bakteri asam laktat dengan karakter penciri gram positif, non motil, non endospora dan katalase negatif (ada yang positif) (Axelsson, 1998). Karakter bentuk dan susunan sel menjadi karakter pembeda ke tingkat genus. Isolat PE6 mempunyai bentuk sel batang sehingga masuk dalam anggota genus *Lactobacillus*, sedangkan isolat PE9, NA4, PI1 dan PI3 mempunyai bentuk sel kokus dengan susunan tetrad sehingga masuk anggota genus *Pediococcus*.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan metode *profile matching* pada tingkat spesies dalam genus *Pediococcus* diketahui bahwa isolat PE9, NA4, PI1 dan PI3 terpisah menjadi dua spesies yang berbeda yaitu *Pediococcus acidilactici* (isolat PE9 dan PI3) dan *Pediococcus pentosaceus* (isolat NA4 dan PI1). Di antara kedua spesies ini sangat sulit dibedakan dengan semua karakter fisiologis yang diuji dan hanya ada satu karakter kunci yang membedakan keduanya yaitu pertumbuhan pada 50°C. *P. acidilactici* mampu tumbuh pada suhu 50°C sedangkan *P. pentosaceus* tidak tumbuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sneath et al. (1986) bahwa dalam sebuah studi terbatas terhadap aldolase yang ditemukan pada pediokokki menunjukkan bahwa *P. pentosaceus* dan *P. acidilactici* merupakan spesies yang berkerabat sangat dekat. Keduanya tidak dapat dibedakan secara

morfologis, kultural dan fisiologis. Axelsson (1998) menambahkan bahwa *P. pentosaceus* dan *P. acidilactici* sulit dibedakan berdasarkan karakter utama yang menjadi pembeda antar spesies dalam genus *Pediococcus* yaitu fermentasi karbohidrat, hidrolisis arginin, pertumbuhan pada variasi pH dan konfigurasi asam laktat yang dihasilkan. Namun demikian keduanya merupakan spesies yang berbeda berdasarkan nilai DNA-DNA relatedness.

Hasil identifikasi pada tingkat spesies dalam genus *Lactobacillus* menunjukkan bahwa isolat PE6 paling dekat masuk menjadi anggota spesies *L. acidophilus*. Banyak di antara anggota genus *Lactobacillus* dilaporkan mempunyai kemampuan memproduksi bakteriosin, termasuk di antaranya anggota spesies *Lactobacillus acidophilus*. Mayra-Makinen dan Bigret (1998) melaporkan bahwa anggota genus *Lactobacillus* yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi bakteriosin antara lain adalah anggota spesies *Lactobacillus fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* dan *Lb. plantarum*. Ouwehand (1998) dalam laporannya menambahkan ada beberapa anggota genus *Lactobacillus* lain yang mempunyai kemampuan memproduksi bakteriosin yaitu *Lb. sake*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii* dan *Lb. reuteri*. Selanjutnya dinyatakan bahwa ada beberapa jenis bakteriosin yang dilaporkan pernah ditemukan pada *Lb. acidophilus* di antaranya adalah *Acidocin 8912*, *Lactacin B* dan *Acidophilucin A*. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat PE6 yang merupakan anggota *Lb. acidophilus* mempunyai kemampuan menghasilkan bakteriosin, dan berarti sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

## KESIMPULAN

Duapuluh enam isolat bakteri asam laktat berhasil diisolasi dari berbagai jenis buah masak. Duabelas di antara duapuluh enam isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Dua isolat terbaik di antaranya (isolat PE6 dan PE9) mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan empat bakteri patogen yaitu *Escherichia coli* FNCC 0091, *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. Isolat PE6 yang berasal dari buah Pepaya mempunyai kemampuan antimikrobia yang lebih baik dan diduga antimikrobia yang dihasilkannya berupa bakteriosin. Hasil identifikasi secara fenetik menunjukkan bahwa isolat PE6 merupakan anggota spesies

*Lactobacillus acidophilus*, isolat PE9 dan PI3 merupakan anggota spesies *Pediococcus acidilactici*, sedangkan isolat NA4 dan PI1 merupakan anggota spesies *Pediococcus pentosaceus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salminen, S. & A.V. Wright (eds). *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York - Basel.
- Bar, N.A., N.D. Harris and R.I. Hill. 1987. Purification and Properties of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 52: 411-415.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives. *Food Technol.*, 43(1):164-167.
- Danil, M. & Lelly. 2000. Bakteri Asam Laktat dari Produk Ikan dan Uji Aktivitas Antibakterinya terhadap Bakteri Patogen dan Perusak. *Jurnal Penelitian Pertanian*, Vol. 19 No. 1: 7-20.
- Djaafar, T.F., E.S. Rahayu, D. Wibowo & S. Sudarmadji. 1996. Antimicrobial Substance Produce by *Lactobacillus sp.* TGR-2 Isolated from Growol. *Indonesian Food and Nutrition progress*. Food and Nutrition Development and Research Center. Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Davidson, P.M. & M.E. Parish. 1989. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. *Food Technology*, 1:148-155.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Mayra-Makinen, A. & M. Bigret. 1998. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In Salminen, S & A.V. Wright (eds.). *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Montville, T.J. & A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial protein: Classification, Nomenclature, Diversity, and relationship to Bacteriocins. In Hoover, D.G. & L.R. Steenson. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc. San Diego.

- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial Component from Lactic Acid Bacteria. In Salminen, S. & A. von Wright (eds.). *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Rahayu, E.S., A.K. Wardani & S. Margino. 2004. Skrining Bakteri Asam Laktat dari Daging dan Produk Olahannya sebagai Penghasil Bakteriosin. *Agritech*.
- Ray, B. & M. Daeschel. 1992. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Salminen, S & A.V. Wright (eds.). 1998. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. new York.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt (eds). 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. William & Wilkins. Baltimore.
- Yang, R. & B. Ray. 1993. Factors Influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 11:281-291.