

# Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin *Lactobacillus fermentum* Asal Dangke pada Media Whey Dangke

(The growth and production bacteriocin of bacteria *Lactobacillus fermentum* using dangke whey as medium)

Rajmi Faridah<sup>1</sup>, Epi Taufik<sup>2</sup> dan Irma Isnafia Arief<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Institut Pertanian Bogor

**ABSTRAK** Dangke merupakan makanan khas Enrekang, Sulawesi Selatan. Dangke menghasilkan hasil sampingan yang disebut whey. Komponen nutrisi yang terkandung dalam whey dapat digunakan oleh bakteri asam laktat (BAL) untuk pertumbuhannya. Salah satu BAL yang dapat memproduksi bakteriosin yaitu *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*). Strain *L. fermentum* asal dangke, yang digunakan dalam penelitian yaitu

A323L, B323K, dan C113L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase logaritmik dari *L. fermentum* strain A323L yaitu pada waktu inkubasi 24-28 jam, sedangkan strain B323K dan C113L pada waktu inkubasi 20-24 jam. Zona hambat dari semua strain *L. fermentum* termasuk kategori lemah pada media pertumbuhan whey dangke, tetapi strain C113L mempunyai daya hambat terbaik.

**Keywords:** *Lactobacillus fermentum*, dangke whey, bakteriosin

**ABSTRACT** Dangke is a local dairy product of Enrekang, South Sulawesi. Dangke processing produced a by-product called whey. Nutritional components in whey can be utilized by lactic acid bacteria (LAB) as a nutritional source of growth. One of bacteriocin producing lactic acid bacteria is *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*). *L. fermentum* strain isolated from dangke, which used

in this research were A323L, B323K, and C113L. The results showed that logarithmic phase of *L. fermentum* strain A323L were occurred at the incubation time of 24-28 hours, while strain B323K and C113L were at 20-24 hours. Inhibition zone of all strain of *L. fermentum* was categorized as weak in whey dangke medium, but strain C113L was the best among them.

**Kata kunci:** *Lactobacillus fermentum*, whey dangke, bakteriosin

2017 Agripet : Vol (17) No. 2 : 81-86

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang mampu memfermentasikan gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat. BAL yang secara alami terdapat dalam pangan dan pemanfaatannya dalam proses fermentasi yang aman dan bermanfaat terhadap kesehatan menjadikannya sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) untuk dikonsumsi oleh manusia (FAO/WHO 2002).

Keunggulan dari BAL yaitu sifatnya yang mampu menghambat bakteri patogen karena menghasilkan senyawa antimikroba yaitu bakteriosin. *Bakteriosin* yang dihasilkan oleh BAL sangat menguntungkan untuk

diterapkan pada industri makanan pada umumnya terutama makanan-makanan hasil fermentasi karena aman untuk kesehatan manusia (Karpinski dan Szkaradkiewicz 2013). Kelebihan dari bakteriosin sebagai pengawet tersebut yaitu aktivitasnya yang mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri kontaminan penyebab pembusukan makanan dan penyakit yang ditularkan melalui makanan (*food borne disease*) (Abdelbasset dan Djamila 2008).

Salah satu jenis BAL yang dapat menghasilkan bakteriosin yaitu *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) (Singh *et al.* 2013; Yong *et al.* 2010). Syah *et al.* (2016) mengemukakan bahwa *L. fermentum* dapat diisolasi dari dangke (sejenis keju segar yang

Corresponding author : epitaufik@apps.ipb.ac.id  
DOI : <https://doi.org/10.17969/agripet.v17i2.8104>

dihasilkan dari susu sapi atau kerbau tanpa proses fermentasi). Faktor yang sangat berpengaruh untuk pertumbuhan *L. fermentum* yaitu media pertumbuhannya (Fardiaz, 1992a). Media pertumbuhan *L. fermentum* yang umum digunakan yaitu *de Man Rogosa Sharp Broth* (MRSB), namun harga di pasaran sangat tinggi. Oleh karena itu perlu adanya alternatif pengganti yang relatif lebih murah. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa *whey* kefir dan *whey* dari berbagai jenis keju dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengganti media tersebut (Almeida *et al.* 2008; Gorsek dan Pecar, 2016; Horackova *et al.* 2014; Lavari *et al.* 2016). *Whey* merupakan hasil sampingan (*by product*) dari pembuatan keju dan produk sejenisnya yang pada umumnya belum dimanfaatkan secara maksimal.

*Whey* dari pembuatan dangke Di Kabupaten Enrekang, Propinsi Sulawesi Selatan, belum dimanfaatkan secara maksimal, sebagian besar hanya terbuang ke lingkungan menjadi limbah. *Whey* dangke mengandung beberapa nutrisi yaitu asam laktat, lemak, protein, dan laktosa (Fatma *et al.* 2012). Studi tentang pemanfaatan *whey* dangke sebagai media pertumbuhan *L. fermentum* asal dangke untuk menghasilkan bakteriosin belum banyak dilakukan. Oleh karena itu sangat penting dilakukan kajian tentang pertumbuhan *L. fermentum* asal dangke tersebut pada media *whey* dangke.

## METODE PENELITIAN

### Prosedur Pengambilan Sampel dan Analisis Data

Dangke diolah dari susu sapi yang dipanaskan dengan api kecil sampai hampir mendidih, kemudian ditambahkan koagulan berupa papain murni 0.3% pada suhu 80 °C, kemudian ditambahkan garam sebanyak 0.4% (Mukhlisah 2017). *Whey* yang merupakan hasil sampingan dari pembuatan dangke tersebut digunakan sebagai sampel penelitian. Strain *L. fermentum* A323L, B323K, dan C113L diisolasi dari dangke diperoleh dari penelitian sebelumnya (Syah *et al.* 2016).

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) pola

faktorial untuk menganalisis nilai total asam tertitrisasi, nilai pH dan total bakteri. Rancangan yang digunakan untuk menganalisis uji aktivitas antimikroba bakteri, bakteriosin dan uji Lowry adalah rancangan acak lengkap (RAL).

### Pengujian Total Bakteri Asam Laktat (Kalsum dan Sjojfan 2012)

Pengujian total bakteri dilakukan dengan metode *pour plate* (Cawan tuang). Sampel yang akan diuji diencerkan dengan pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-8}$ . Satu mL sampel dari pengenceran  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan dengan MRS agar sebanyak 15 mL. Cawan tersebut didiamkan sampai memadat lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

### Pengukuran pH (AOAC 2005)

pH meter dinyalakan dan dinetralkan selama 15-30 menit dan distandardisasi dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7. pH meter dicelup pada sampel lalu dibiarkan sampai angka pH meter stabil.

### Pengujian Total Asam Tertitrisasi (TAT) (AOAC 2005)

Total asam tertitrisasi dapat dianalisis dengan metode titrasi dengan NaOH 0.1 N dan penoftalin 1% sebagai indikator.

### Uji Aktivitas Antimikroba (Hosni *et al.* 2013)

*E. coli* dan *S. aureus* sebagai bakteri uji diencerkan sesuai dengan standar 0.5 McFarland ( $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>) kemudian diratakan pada media MHA. *Paper disc* steril kemudian dimasukkan ke dalam sampel 50 µL kemudian diletakkan pada media lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi zona bening yang terbentuk kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

### Purifikasi dengan Menggunakan Presipitasi Amonium Sulfat (Arief *et al.* 2015b)

*Whey* 100% masing-masing diinokulasi dengan 3 strain *L. fermentum* berbeda sebanyak 10% (v/v), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, selanjutnya

dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Supernatan kemudian disaring menggunakan membran saring *miliphore* berdiameter 0.22  $\mu\text{m}$ . Supernatan bebas sel kemudian dievaporasi dengan menggunakan Heidolph VV *micro evaporator*. Presipitasi dilakukan dengan penambahan serbuk amonium sulfat hingga mencapai konsentrasi 80%. Presipitan (endapan) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 20 menit. Presipitat bakteriosin kemudian didialisis dengan menggunakan membran dialisis berdiameter 20  $\mu\text{m}$  dan direndam dalam bufer fosfat pH 6.8 selama 12 jam. Buffer diganti sebanyak 3 kali yaitu pada jam kedua, keempat, dan keenam.

#### Analisis Konsentrasi Protein metode Lowry (Lowry *et al.* 1951)

Sampel bakteriosin kasar sebanyak 0.2 mL dimasukkan ke dalam kuvet ditambahkan dengan akuades sebanyak 3.8 mL, selanjutnya ditambahkan dengan pereaksi Lowry sebanyak 5.5 mL kemudian diinkubasi selama 10-15 menit. Selanjutnya yaitu menambahkan folin sebanyak 0.5 mL lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit. Absorban dibaca pada A 650 nm. Kurva standar dibuat dengan menggunakan BSA dengan konsentrasi 0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 dan 1.0 mg mL<sup>-1</sup>.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

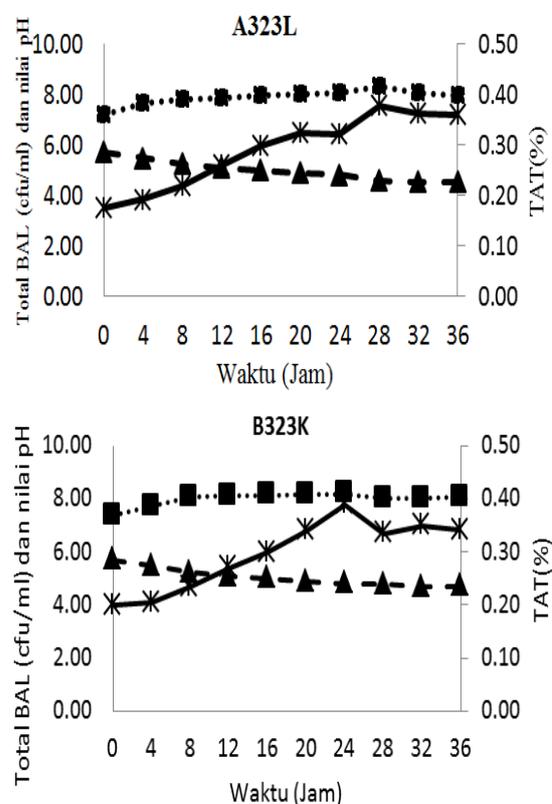
#### Kurva Pertumbuhan (Total BAL, Nilai TAT dan Nilai pH)

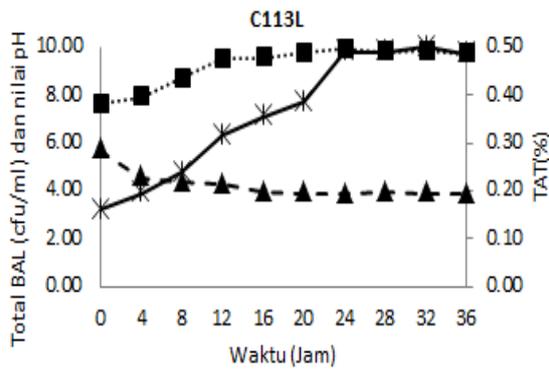
Pada ketiga strain *L. fermentum* memenuhi populasi (total BAL) yang berpengaruh nyata pada media *whey* dangke (P<0.05). Hal tersebut menunjukkan bahwa dangke dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan bakteri. Fatma *et al.* (2012) melaporkan bahwa *whey* dangke dapat digunakan sebagai media pertumbuhan BAL karena mempunyai kandungan nutrisi (protein dan laktosa) yang dapat digunakan untuk pertumbuhannya.

Ketiga strain terus mengalami peningkatan hingga 20-28 jam waktu inkubasi sebesar 8.29-9.94cfuml<sup>-1</sup> dan mengalami penurunan secara perlahan setelah jam

tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa *L. fermentum* mengalami fase logaritmik pada jam ke 20-28. Kalsum dan Sjojfan (2012) melaporkan bahwa pertumbuhan *L. fermentum* pada media MRSB mengalami fase logaritmik pada 22 jam waktu inkubasi sedangkan pada media *rice bran* adalah 18 jam inkubasi. Perbedaan tersebut disebabkan karena kandungan protein pada media *whey* dangke masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan MRSB.

Nilai TAT pada ketiga strain *L. fermentum* mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan jumlah bakteri asam laktat hingga 0.38-0.42%. Ketiga strain memberi respon yang sangat nyata terhadap TAT (P<0.05). Peningkatan tersebut disebabkan karena *L. fermentum* merombak kandungan nutrisi pada *whey* dangke menjadi asam laktat. Panesar *et al.* (2007) mengemukakan adanya  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan oleh mikroorganisme menyebabkan laktosa yang ada dalam produk terhidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa. Kurva pertumbuhan *L. fermentum* dapat dilihat pada Gambar 1.





Gambar1. Kurva pertumbuhan *L. fermentum* A323L, B323K dan C113L.  
 •■• Total BAL, —▲— pH, —\*— TAT.

Kondisi asam laktat berbanding terbalik dengan kondisi pH yang semakin menurun seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi. Strain *L. fermentum* yang berbeda memberi respon yang sangat nyata terhadap nilai pH ( $P < 0.05$ ). Adanya ion  $H^+$  yang dihasilkan oleh asam laktat dari proses disosiasi dapat menurunkan nilai pH. Nilai pH yang dihitung merupakan konsentrasi  $H^+$  yang dihasilkan selama proses fermentasi. Semakin banyak asam laktat yang dihasilkan maka konsentrasi ion  $H^+$  semakin meningkat dan terukur di pengukuran pH (Charalampopoulos *et al.* 2003).

**Aktivitas Antimikroba *L. fermentum* A323L, B323K, C113L**

Ketiga strain *L. fermentum* memberi respon nyata terhadap zona hambat terhadap *E. coli* dan *S. aureus* ( $P < 0.05$ ). Hasil uji aktivitas antimikroba dapat dilihat pada Tabel 1. Diameter zona hambat ketiga strain terhadap *E. coli* dan *S. aureus* termasuk kategori lemah karena nilainya kurang lebih dari 3 mm setelah dikurangi dengan diameter *paper disc*. Panet *al.* (2009) menyatakan bahwa Kekuatan aktivitas antimikroba dikategorikan pada ukuran diameter zona hambat: diameter zona hambat sama dengan diameter sumur atau zona hambat 0 mm berarti tidak ada penghambatan (-), diameter diantara 0-3 mm berarti penghambatan lemah (+), diameter diantara 3-6 mm berarti penghambatan sedang (++) atau bagus, dan diameter lebih besar dari 6 mm berarti aktivitas penghambatan kuat (+++).

Hasil uji aktivitas antimikroba strain *L. fermentum* dapat dilihat pada Tabel 1.

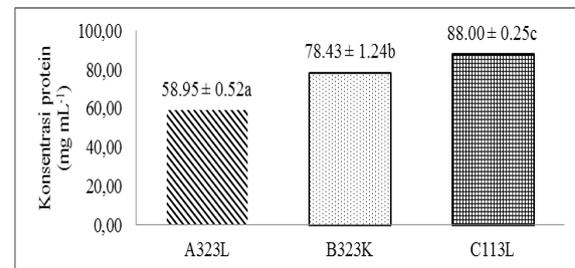
Tabel 1. Hasil Uji aktivitas antimikroba *L. fermentum* A323L, B323K, C113L

Bakteri Indikator	Strain <i>L. fermentum</i> (mm)		
	A323L	B323K	C113L
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.15±0.00a	2.36±0.01b	3.07±0.06c
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	2.82±0.02a	3.10±0.01b	3.34±0.09c

Huruf di belakang angka yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ).

**Konsentrasi Protein**

Ketiga strain *L. fermentum* memberi respon yang berpengaruh nyata terhadap konsentrasi protein ( $P < 0.05$ ). Hasil tersebut sejalan dengan kurva pertumbuhan dan hasil uji aktivitas antimikroba. Konsentrasi protein diperoleh dari hasil purifikasi yaitu tahap pemurnian menggunakan amonium sulfat yang bertujuan untuk pengendapan. Selanjutnya dilakukan tahap dialisis menggunakan membran dialisis dan akhirnya menghasilkan bakteriosin kasar. Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi bakteriosin dari strain C113L nyata lebih tinggi dibandingkan dengan strain lainnya ( $P < 0.05$ ). Singh *et al.* (2013) menyatakan bahwa produksi bakteriosin sangat ditentukan oleh kandungan nutrisi dalam media pertumbuhan. Hasil penelitian Arief *et al.* (2015a) dengan menggunakan spesies bakteri berbeda yaitu *L. plantarum* menghasilkan protein bakteriosin yaitu 117.1-178,4 mg mL<sup>-1</sup> pada tahap pemurnian menggunakan amonium sulfat dan 40.1-97.9 mg mL<sup>-1</sup> setelah tahap pemurnian menggunakan *cation exchange chromatography*. Konsentrasi protein bakteriosin kasar ketiga strain *L. fermentum* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Konsentrasi protein strain *L. fermentum* masing-masing strain.  
 (▨) A323L, (□) B323K, (■) C113L.

## Aktivitas Antimikroba Strain *L. fermentum* setelah purifikasi

Bakteriosin yang dipurifikasi dari setiap strain *L. fermentum* memberi respon nyata terhadap daya hambat *E. coli* dan *S. aureus* ( $P < 0.05$ ). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen baik Gram positif maupun Gram negatif. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Karpiński dan Szkaradkiewicz (2013) yang menyatakan bahwa bakteriosin merupakan substrat protein antimikroba yang dapat menghambat bakteri Gram positif dan Negatif. Daya hambat semua strain *L. fermentum* terhadap *S. aureus* dan *E. coli* termasuk kategori lemah karena nilainya kurang lebih 3 mm setelah dikurangi dengan diameter *paper disc*. Hal tersebut berdasarkan pendapat Pan *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa diameter diantara 0-3 mm berarti penghambatan lemah (+) sedangkan daya hambat antara 3-6 mm termasuk kategori sedang. Hal tersebut disebabkan bahan komponen terbesar dari bakteriosin adalah protein (Karpiński dan Szkaradkiewicz 2013). *Whey* dangke yang digunakan untuk pertumbuhan *L. fermentum* hanya mengandung protein sebesar  $0.36\% (20 \text{ mL})^{-1}$ , sebagian besar terkoagulasi menjadi curd dangke. Hasil uji aktivitas antimikroba strain *L. fermentum* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2 Uji aktivitas antimikroba strain *L. fermentum* setelah purifikasi

Bakteri Indikator	Strain <i>L. fermentum</i> (mm)		
	A323L	B323K	C113L
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.97±0.02a	2.32±0.00b	2.58±0.08c
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	2.69±0.02a	2.95±0.01b	3.35±0.06c

Huruf di belakang angka yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ).

## KESIMPULAN

*L. fermentum* strain A323L, B323K, C113L yang diisolasi dari dangke hanya mampu menghasilkan daya hambat kategori lemah pada media *whey* dangke. Namun diantara ketiganya, berdasarkan semua peubah yang diamati, strain yang terbaik adalah C113L.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelbasset, Djamila, K., 2008. Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria strained from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *Afr J Biotech*.7(16).
- Almeida, K., Tamime, A., Oliveira, M., 2008. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese *whey*. *LWT Food Sci Technol*. 41(2):311-316.
- AOAC (Association Official Analytical Chemistry), 2005a. Official Method of Analysis. 18<sup>th</sup> Ed. Washington D.C.
- Arief, I.I., Budiman, C., Jenie, B.S.J., Andreas, E., dan Yuneni, A., 2015a. Plantaricin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Benef Microbes*6(4):603-613.
- Arief, I.I., Jenie, B.S.L., Astawan, M., Fujiyama, K., Witarto, A.B., 2015b. Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian J Anim Sci*.9:25-36.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S., Webb, C., 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *Int J Food Microbiol*. 82(2):133-141.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2002. Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food. London (UK): Ontario.
- Fardiaz, S., 1992a. *Mikrobiologi Pangan I*. PT. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Fardiaz, S., 1992b. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta (ID): PT. Raja Garfindo Pesada.
- Fatma, Soeparno, S., Nurliyani, N., Hidayat, C., Taufik, M., 2013. Karakteristik *Whey* Limbah Dangke dan Potensinya Sebagai Produk Minuman dengan Menggunakan *Lactobacillus acidophilus* Fnc 0051 (Characteristics of *Whey* from Dangke Waste and Its Potential as Beverage Product by using *Lactobacillus*

- acidophilus* FNCC 0051). *J Agritech.* 32(04).
- Hosni, K., Hassen, I., Sebeic, H., Casabianca, H., 2013. Secondary metabolites from *Chrysanthemum coronarium* (Garland) flowerheads: Chemical composition and biological activities. *Indus Crops Prod.* 44:263-271.
- Kalsum, U., Sjojfan, U., 2012. The growth of *Lactobacillus fermentum* strain from quail intestine on rice bran medium. *J Trop Life Sci.* 2(3):58-61.
- Karpiński, T., Szkaradkiewicz, A.K., 2013. Characteristic of bacteriocines and their application. *Pol J Microbiol.* 62(3):223-235.
- Lavari, L., Lanniello, R., Paez, R., Zotta, T., Cuatrin, A., Reinheimer, J., Parente, E., Vinderola, G., 2016. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in wheypermeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. *LWT Food Sci Technol.* 63: 322-330.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrar, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Mukhlisah, A.N., 2017. Kualitas kimia, fisik dan cemaran mikroba dangke sebagai respon terhadap perbedaan suhu pemanasan dan konsentrasi papain. [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z., 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J Food Control.* 20:598-602.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *F Chem.* 105:1-14.
- Singh, R., Sivasubramani, K., Jayalakshmi, S., 2013. Strainion and production of bacteriocin by marine *Lactobacillus fermentum* SBS001. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2(4):67-73.
- Syah, S.P., Sumantri, C., Arief, I.I., Taufik, E., 2016. Strainion and identification of indigenous lactic acid bacteria by sequencing the 16S rRNA from dangke, a traditional cheese from Enrekang, South Sulawesi. *Pakistan J of Nutrition.*