

Skrining Bakteri Asam Laktat asal Susu Kambing Peranakan Etawa sebagai Penghasil Bakteriosin

Indah Nur Fitria¹⁾, Tri Ardyati²⁾

^{1),2)}Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

^{1).}indahnfitria@gmail.com dan ²⁾ tri_ardiyati@yahoo.com

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan mikroorganisme yang tergolong GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Sebagian besar BAL memiliki potensi sebagai penghasil bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang disintesis oleh ribosom dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh BAL penghasil bakteriosin dan mempelajari daya hambat bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga kali ulangan. Tahapan dilakukan dengan isolasi BAL asal susu kambing Peranakan Etawa (PE) pada media MRS ditambah dengan CaCO₃ 1%, karakterisasi isolat BAL, deteksi penghambatan kultur BAL terhadap bakteri uji, uji aktivitas penghambatan bakteriosin (CFS) terhadap bakteri uji, uji sensitivitas bakteriosin terhadap enzim proteolitik, serta identifikasi BAL dengan menggunakan API 50 CHL test kit. Dua belas isolat diperoleh dari isolasi, namun hanya 6 isolat (SKE5, SKE7, SKE8, SKE9, SKE10, dan SKE11) diduga mampu menghasilkan bakteriosin. Bakteriosin yang diproduksi oleh keenam isolat tersebut dapat terdegradasi oleh enzim Proteinase K (1 mg/ml). Isolat SKE9 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus curvatus* merupakan kandidat isolat BAL terbaik karena menghasilkan bakteriosin dan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium* dengan indeks penghambatan masing-masing sebesar $2,94 \pm 0,59$ dan $2,89 \pm 0,89$.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, Bakteriosin, Susu kambing Peranakan Etawa

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms include in group of generally recognized as safe. Most of LAB have potency as bacteriocin producers. Bacteriocin is ribosomally synthesized protein able to inhibit the growth of other bacteria. The aim of this research were to obtain lactic acid bacteria isolated from crossbreed Etawa (PE) goat's milk able to produce bacteriocin and to study the effect of bacteriocins from LAB against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella thypimurium*. The steps of the research were isolation of LAB using MRS medium containing 1% of CaCO₃, characterization of LAB, detection the inhibition activity of culture against pathogenic bacteria, assay of bacteriocin (CFS) against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella thypimurium*, assay of bacteriocin sensitivity to proteolytic enzyme, and identification of isolate using API 50 CHL test kit. Total of twelve isolates were obtained, however only 6 isolates (SKE5, SKE7, SKE8, SKE9, SKE10, SKE11) were able to produce bacteriocin. All of bacteriocin produced were degraded by proteolytic enzymes, proteinase K (1mg/ml). Isolate SKE9 was identified as *Lactobacillus curvatus*, the best candidate of bacteriocin producer against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella thypimurium* with inhibition index of 2.94 ± 0.59 dan 2.89 ± 0.89 , respectively.

Keyword: Bacteriocin, Crossbreed Etawa goat's milk, Lactic acid bacteria

PENDAHULUAN

Susu kambing PE merupakan jenis susu yang mengandung nutrisi lengkap sehingga merupakan media pertumbuhan yang ideal untuk

mikroorganisme [1]. Salah satu kelompok utama bakteri yang tumbuh pada susu adalah bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang tergolong sebagai *Generally Recognized as Safe* (GRAS)

yang menghasilkan senyawa antimikroba antara lain asam organik, diasetil dan bakteriosin. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan bakteri patogen [2]. Oleh karena itu, bakteri asam laktat telah banyak digunakan untuk memperpanjang umur simpan (*shelf life*) suatu produk atau dijadikan sebagai alternatif pengawetan makanan [3].

Oleh karena itu bakteriosin sangat penting bagi pengembangan industri pangan. Sehingga diperlukan eksplorasi bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan bakteriosin.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal susu kambing PE. Susu kambing PE diperoleh dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) – Singosari. Sebanyak 25 ml sampel susu kambing PE dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0,85 % untuk memperoleh seri pengenceran 10^{-1} . Pengenceran bertingkat dilakukan hingga 10^{-6} . Bakteri asam laktat diisolasi menggunakan media *de Man, Rogosa and Sharpe* agar (MRS) yang mengandung 1% CaCO_3 dengan metode *pour plate*. Isolat BAL yang tumbuh dicirikan oleh adanya zona bening dan dimurnikan hingga diperoleh koloni tunggal dan ditumbuhkan pada media MRS agar miring sebagai stok [4]. Isolat BAL dikarakterisasi dengan pengamatan morfologi koloni, uji katalase dan pewarnaan Gram.

Deteksi Penghambatan Kultur BAL terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. Satu ose isolat BAL yang berumur 24 jam diinokulasikan dalam 10 ml media MRS *broth* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium* dikulturkan pada 20 ml media NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi pada suhu 37 °C hingga mencapai densitas sel 10^6 CFU/ml. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *agar well diffusion*. Masing-masing kultur bakteri uji diinokulasikan secara *spread plate* sebanyak 100 μl ke dalam cawan petri yang mengandung media NA yang telah memadat dan dibiarkan hingga mengering. Kultur isolat BAL kemudian

diinokulasikan ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 40 μl [5]. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pengujian Penghambatan (CFS) Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. Persiapan *cell free supernatant* (CFS) dilakukan dengan menumbuhkan isolat terpilih dalam 10 ml MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sebanyak 5 ml dari hasil kultur tersebut diinokulasikan ke dalam 45 ml MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur bakteri yang telah berumur 48 jam disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm, selama 15 menit. Supernatan diambil dan diatur pHnya dengan menggunakan NaOH (1,0 M) menjadi pH 6,5. Supernatan difiltrasi dengan menggunakan *membrane filter* steril yang berukuran 0,22 μm .

Sebanyak 100 μl bakteri uji dengan densitas 10^6 CFU/ml diinokulasikan secara *spread plate* ke dalam media NA yang telah memadat. Setelah hasil *spread plate* mengering, kultur isolat BAL kemudian diinokulasikan ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 50 μl [5]. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Sensitivitas Bakteriosin terhadap Enzim Proteolitik. Larutan Proteinase K dalam 20 mM Tris HCl pH 7 konsentrasi 1 mg/ml digunakan sebagai enzim proteolitik. Supernatan bebas sel yang telah dinetralkan dan difiltrasi kemudian dicampur dengan enzim Proteinase K dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit. Pengujian dilakukan dengan metode *agar-well diffusion* terhadap bakteri uji. Kontrol berupa supernatan bebas sel yang tidak dilakukan penambahan enzim proteolitik [6].

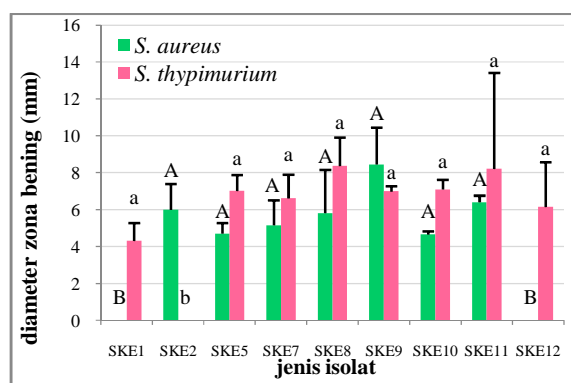
Identifikasi isolat BAL dengan API 50 CHL test kit. Sebanyak dua ose isolat BAL yang telah berumur 84 jam diinokulasikan ke dalam 5 ml aquades steril. Selanjutnya suspensi tersebut diinokulasikan sebanyak 2 ml ke dalam 5 ml aquades steril hingga kekeruhan mencapai 2 McFarland. Sebanyak 4 ml larutan pada

kekeruhan 2 McFarland diinokulasikan ke dalam ampul yang berisi medium API 50 CHL dan dihomogenasi.

Isolat BAL yang terdapat pada medium API 50 CHL diambil dengan mikropipet steril dan diinokulasikan ke dalam *strip* yang telah berisi media karbohidrat kemudian ditutup dengan *mineral oil* sebanyak dua tetes pada masing-masing *strip*. Selanjutnya *strip* media API 50 CHL tersebut diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. Pengamatan dilakukan dengan mencatat hasil uji positif atau negatif pada setiap *strip*. Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna reagen menjadi berwarna kuning dan khusus untuk *strip* nomor 25 berwarna hitam. Hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada *strip* (warna biru keunguan). Hasil pengujian dianalisis dengan menggunakan *API Web Software* [7].

HASIL DAN PEMBAHASAN

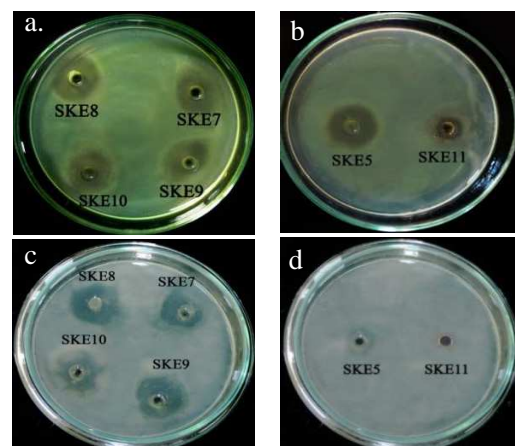
Sebanyak dua belas isolat BAL yaitu SKE1, SKE2, SKE3, SKE4, SKE5, SKE6, SKE7, SKE8, SKE9, SKE10, SKE11, dan SKE12 diperoleh dari hasil isolasi. Isolat tersebut membentuk zona bening pada media MRS agar yang mengandung CaCO₃ 1 %. Semua isolat BAL yang diperoleh merupakan Gram positif dan katalase negatif. Isolat SKE5 memiliki kemiripan dengan Genus *Pediococcus* karena memiliki bentuk sel tetrad dan memiliki koloni berwarna putih [8].



Gambar 1. Penghambatan kultur BAL asal susu kambing PE terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*

Tujuh isolat BAL memiliki penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan delapan isolat dapat menghambat pertumbuhan kultur BAL terhadap bakteri uji tersebut tidak berbeda nyata satu sama lain. Kemampuan antimikroba isolat BAL terhadap bakteri uji berbeda-beda, dikarenakan masing-masing isolat BAL menghasilkan metabolit yang berbeda-beda. Perbedaan metabolit yang dihasilkan dipengaruhi oleh tipe metabolisme BAL [9]. Enam isolat, yaitu SKE5, SKE7, SKE8, SKE9, SKE10, SKE11, dan SKE12 merupakan isolat terpilih karena kultur BAL tersebut mampu menghambat kedua bakteri uji (Gambar 1).

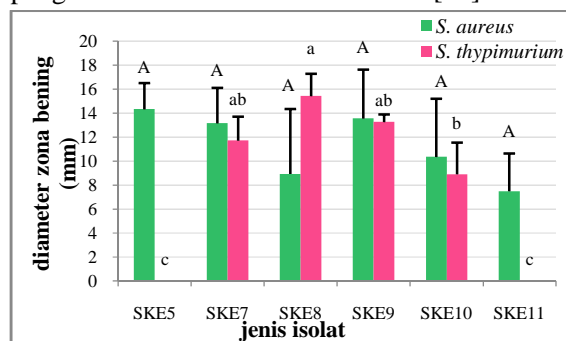
Nilai diameter zona bening pada penghambatan bakteriosin (CFS) tidak berbeda nyata, namun penghambatan tertinggi oleh isolat SKE5 ($14,34 \pm 2,18$ mm) diikuti oleh isolat SKE9 dengan diameter sebesar $13,55 \pm 4,09$ mm. Penghambatan bakteriosin (CFS) terhadap *Salmonella thypimurium* terjadi hanya pada empat isolat yaitu SKE7, SKE8, SKE9, dan SKE10. Diameter tertinggi oleh SKE8 ($15,44 \pm 1,85$ mm) tidak berbeda nyata dengan SKE9 dan SKE7 secara berturut-turut sebesar $11,66 \pm 1,88$ mm dan $12,77 \pm 0,40$ mm (Gambar 3).



Gambar 2. Penghambatan bakteriosin (CFS) isolat BAL terhadap *Staphylococcus aureus* (a dan b) dan *Salmonella thypimurium* (c dan d)

Nilai indeks penghambatan bakteriosin (CFS) terhadap *Salmonella thypimurium* tertinggi adalah oleh SKE8 sebesar $3,21 \pm 0,26$

dan tidak berbeda secara signifikan terhadap SKE7 dan SKE9. Nilai indeks penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* oleh SKE5 dan SKE9 berturut-turut adalah sebesar $3,05 \pm 0,31$ dan $2,94 \pm 0,59$. Indeks penghambatan BAL terhadap *Salmonella thypimurium* tertinggi adalah oleh isolat SKE8 dan diikuti isolat SKE9 masing-masing sebesar $3,21 \pm 0,26$ dan $2,89 \pm 0,89$. Sebagian besar bakteriosin tidak mampu menghambat bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan membran sel bagian luar dari bakteri Gram negatif bertindak sebagai penghalang (*barrier*) mekanisme aksi bakteriosin yang terjadi pada bagian membran sitoplasma [10]. Beberapa mekanisme bakteriosin membunuh bakteri target yaitu dengan merusak dinding sel mikroba target, destabilisasi membran sitoplasma, mengubah struktur asam nukleat, menghambat kerja enzim, penghambatan sintesis asam nukleat [11].



Gambar 3. Penghambatan bakteriosin (CFS) isolat BAL asal susu Kambing PE terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*

Pemberian Proteinase K pada CFS yang telah dinetralkan mengakibatkan tidak terbentuknya zona bening disekitar sumuran. Hal ini dikarenakan CFS mampu terdegradasi oleh enzim Proteinase K (1 mg/ml). Bakteriosin merupakan protein yang mampu terdegradasi oleh keberadaan enzim proteolitik [12]. Dapat diduga bahwa semua isolat terpilih mampu menghasilkan bakteriosin.

Berdasarkan API 50 CHL *test kit*, isolat SKE9 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus curvatus* spp *curvatus* dengan % ID sebesar 99,8%. *Lactobacillus curvatus* merupakan BAL yang

mampu menghasilkan bakteriosin yaitu curvaticin. Curvaticin diketahui memiliki spektrum antimikroba terhadap beberapa strain bakteri antara lain *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis* [13]. Berdasarkan penelitian ini, dapat diketahui bahwa curvaticin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus curvatus* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*.

KESIMPULAN

Terdapat enam isolat BAL asal susu kambing PE yaitu SKE5, SKE7, SKE8, SKE9, SKE10, SKE11 yang diduga mampu memproduksi bakteriosin. Isolat-isolat tersebut mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*, tetapi isolat SKE5 dan SKE11 hanya mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Kandidat isolat terbaik berdasarkan indeks penghambatan penghasil bakteriosin adalah SKE9 dan SKE8. Isolat SKE9 telah teridentifikasi sebagai *Lactobacillus curvatus*. Bakteri tersebut mampu menghasilkan bakteriosin yang menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium* dengan indeks penghambatan cukup tinggi masing-masing sebesar $2,94 \pm 0,59$ dan $2,89 \pm 0,89$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Ibu Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D., Dr. Suharjono, M.Si. dan Dr. Ir. Nur Hidayat, MP yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Haenlein, G. 2004. *Goat Milk In Human Nutrition*. Small Ruminant Res 51(2):155–163.
- [2] Gonzales, B., Arca P., Mayo B., dan Saurez, J. 1996. *Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin*. Applied and Environmental Microbiology. 6:2158-2163.

- [3] Navaro, L., Zaraxaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F. dan Torres C. 2000. *Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From Rioja Red Wines*. Journal of Applied Microbiology. 88:44-51.
- [4] Sujaya I. N., Amachi S., Yokota A., Asona A., dan Tomita F. 2000. *Isolation and characterization of lactic acid bacteria in ragi tape*. World Journal of Microbiology Biotechnology. 17: 349-357.
- [5] Yang, E., Lihua F., Yueming J., Craig D. dan Sherry F. 2012. *Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts*. AMB Express.
- [6] El-Shouny, W.A. 2006. *Characterization of bacteriocin from Pseudomonas aeruginosa*. El -Minia Science bull. 17(2): 279-304.
- [7] Cappuccino, J. G. 1983. Microbiology: A Laboratory Manual. Addison-Wesley: USA.
- [8] Axelsson, L. 2004. *Lactic acid Bacteria: Classification and physiology*. In: Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., editors. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [9] Charlier, C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y. 2009. *Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives*. International Journal of Food Microbiology 131:30–39
- [10] Raetz, C.R.H. dan Whitfield C. 2002. *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annual Review of Biochemistry 71: 635–700.
- [11] Luders T., Birkemo G.A., Fimland G., Nissen-Meyer J., Nes I.F. 2002. *Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria*. Applied and Environmental Microbiology 69: 1797-1799
- [12] Tatsadjieu, N.L., Njintang N.Y., Kemgang S. T., Daoudou B., dan Mbofung C.M.F. 2009. *Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken Salmonella enterica and Escherichia coli*. African Journal of Microbiology Research. 3(5): 220-227.
- [13] Bouttefroy, A., Linder M. dan MillieÁre J.B. 2000. *Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behaviour of Listeria monocytogenes ATCC 15313 in broth*. Journal of Applied Microbiology. 88:919-929.