

Seleksi Potensi Bakteri Probiotik Indigenus Riau sebagai Agen Biopreservatif Bahan Pangan

NUR ASYIAH WULANDARI*, BERNADETA LENI FIBRIARTI,
RODESIA MUSTIKA ROZA

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Riau, Pekanbaru 28293

*email: nurasyiah_wulandari@yahoo.com

ABSTRAK

Penggunaan pengawet tidak aman untuk dikonsumsi dan sangat berbahaya bagi kesehatan. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri probiotik yang dapat menghasilkan bakteriosin yang dapat digunakan sebagai agen biopreservatif. Bakteriosin sudah banyak diaplikasikan sebagai pengawet makanan, tetapi secara komersial ketersediaannya masih sedikit dan harganya mahal. Penelitian ini dilakukan untuk menguji kemampuan 23 isolat bakteri probiotik lokal Riau dalam menghasilkan bakteriosin. Total Populasi BAL dihitung dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Uji penghambatan BAL terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dilakukan dengan metode sumuran (*well diffusion*). Uji konfirmasi antimikroba bakteriosin dilakukan pada suhu 100°C selama 15 menit, 30 menit dan 60 menit. Total populasi BAL tertinggi yaitu PSG4 ($22,45 \times 10^6$ cfu/ml) dan yang terendah SLK2 ($4,75 \times 10^6$ cfu/ml). BAL yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047 yaitu PSG2 (15,1 mm) dan terendah SLK2 (10,75 mm) dengan aktivitas bakteriosin berturut-turut $2575 \text{ mm}^2/\text{ml}$ dan $792,6 \text{ mm}^2/\text{ml}$. Hasil dari uji konfirmasi bakteriosin menunjukkan adanya zona hambat pada isolat JN5, PSG2 dan SLK2 dengan zona hambat terbesar pada pemanasan 30 menit dan 60 menit (19,2 mm, 19,5mm dan 16,8 mm) dan yang terkecil selama 60 menit dan 15 menit (12,8 mm, 15,6 mm dan 14,7 mm).

Kata kunci : Bakteri probiotik, bakteriosin, biopreservatif, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

ABSTRACT

The use of synthetic preservatives is not safe for consumption and very dangerous for health. Lactic acid bacteria (LAB) is a probiotic bacterium that can produce bacteriocins as biopreservatives agents. Bacteriocins have been widely applied as a food preservative, but its commercial availability is still low and very expensive. This study was conducted to test the ability of 23 isolates of local probiotic bacteria in Riau to produce bacteriocins. LAB total population was calculated by *Total Plate Count* (TPC) method. LAB inhibition test against indicator bacteria *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 was conducted using *well diffusion* method. Bacteriocins antimicrobial confirmatory test was performed at 100°C for 15 minutes, 30 minutes, and 60 minutes. The result showed that the highest LAB population was PSG4 (22.45×10^6 cfu/ml) and the lowest was SLK2 (4.75×10^6 cfu/ml). The greatest inhibitory activity against indicator bacteria *S. aureus* FNCC 0047 was found in PSG2 (15.1 mm) and the smallest was in SLK2 (10.75 mm) with the activity of bacteriocins $2575 \text{ mm}^2/\text{ml}$ and $792.6 \text{ mm}^2/\text{ml}$ respectively. The bacteriocins confirmatory test showed clear zone of isolates JN5, PSG2, and SLK2 with the largest inhibition zone was during heating for 30 minutes and 60 minutes (19.2 mm, 19.5 mm, and 16.8 mm) while the smallest was for 60 minutes and 15 minutes (12.8 mm, 15.6mm, and 14.7 mm).

Keywords: Probiotic bacteria, biopreservatives, bacteriocins, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

PENDAHULUAN

Bakteri Asam Laktat (BAL) disebut juga dengan bakteri probiotik. BAL merupakan jenis bakteri yang menguntungkan, tidak bersifat patogen dan aman, sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk pangan. BAL dapat memberikan citarasa pada makanan, menghambat bakteri pembusuk pada makanan maupun pakan dan juga dapat menghambat bakteri patogen (Antara, 2004). Oleh karena itu, dalam industri makanan BAL memiliki reputasi aman dan dikenal dengan *food grade organisms* atau disebut juga *Generally Recognized as Safe* (GRAS).

Bakteriosin adalah protein antimikroba yang memperlihatkan suatu respon berlawanan terhadap bakteri tertentu dan diproduksi dari bakteri asam laktat, akan tetapi tidak semua BAL mampu memproduksi protein antimikroba ini. Biopreservasi mulai menarik perhatian karena bakteriosin berpotensi untuk dijadikan pengawet pada pangan maupun pakan dengan mengontrol bakteri pembusuk dan patogen secara alami (Mataragas, 2003). Beberapa negara sudah menggunakan bakteriosin komersial seperti nisin sebagai agen biopreservatif (pengawet alami) untuk memperpanjang masa simpan produk makanan dengan dosis yang bervariasi. Bakteriosin sudah banyak diaplikasikan sebagai *food preservative*, tetapi secara komersial ketersediaannya masih sedikit dan harganya relatif mahal.

Sari (2014) telah berhasil mengisolasi 29 isolat BAL dari buah-buahan di Riau (jambu nasi-nasi, manggis, nanas madu, salak, sirsak dan pisang barangan), namun potensi isolat-isolat BAL indigenus Riau ini dalam menghasilkan bakteriosin belum diketahui. Penelitian tentang isolasi BAL dan bakteriosin telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu dan fermentasi, namun belum begitu banyak yang diisolasi dari buah-buahan. Karbohidrat dan asam-asam organik yang terkandung secara alami dalam buah-buahan merupakan medium pertumbuhan yang baik bagi BAL.

Sampai saat ini eksplorasi BAL sebagai penghasil bakteriosin dari buah-buahan di Riau belum ada sama sekali, sehingga dalam penelitian ini dilakukan seleksi kemampuan ke-29 isolat BAL indigenus Riau tersebut (Sari, 2014) dalam menghasilkan bakteriosin. Diharapkan dari penelitian ini diperoleh isolat BAL indigenus Riau yang potensial dalam menghasilkan senyawa bioaktif bakteriosin, yang selanjutnya dapat diaplikasikan sebagai agen biopreservatif.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2014 – September 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Petridish, tabung reaksi, erlenmeyer, *beaker glass*, rak tabung reaksi, autoklaf, timbangan, vortex, mikropipet volume, ose, bunsen, shaker inkubator, kertas saring, jangka sorong dan *sentrifuge*. Adapun bahan yang digunakan adalah isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari buah-buahan lokal di Riau (jambu nasi-nasi, salak, pisang barangan, nanas madu, sirsak, dan manggis) (Sari, 2014) koleksi Laboratorium Mikrobiologi UR, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, aquades, agar bakto, pepton, *yeast ekstrak*, *beef ekstrak*, glukosa, MgSO₄, MnSO₄, K₂HPO₄, diammonium hydrogen sitrat, tween 80, natrium asetat, MnSO₄, CaCO₃, trypton, arginin, agardan akuades.

Peremajaan 29 isolat BAL

Peremajaan isolat BAL dilakukan dengan menginokulasikan ke 29 isolat BAL pada medium NA miring dengan cara *streak* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C.

Aktivasi isolat BAL

Aktivasi isolat BAL dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat BAL ke dalam 10 ml MRS broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan dilakukan pengenceran sampai 10⁻⁵. Dipipet sebanyak 1 ml dari pengenceran 10⁻⁵, kemudian disebarkan diatas medium MRS agar yang telah memadat di dalam cawan petri dan diratakan menggunakan *dryglaski*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24-48 jam (duplo) dan dihitung jumlah koloni dengan menggunakan TPC (*Total Plate Count*) (Usmiati & Marwati, 2007). Koloni yang dihitung yaitu koloni yang jumlahnya memenuhi standar antara 30-300 koloni.

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

Uji kemampuan menghambat bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dilakukan dengan mempersiapkan isolat BAL dalam bentuk metabolit ekstraseluler dengan cara

menginokulasikan kultur BAL sebanyak 2,5 ml kedalam 50 ml medium TGYE cair kemudian diinkubasi selama 96 jam (Bar & Harris, 1987). Pada akhir inkubasi disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Supernatan disaring dengan membran filter (whatman diameter 0,2 µm), sehingga diperoleh metabolit ekstraseluler steril (Sarkono, 2010). Uji menghambat pertumbuhan *S. aureus* FNCC 0047 dilakukan dengan metode difusi sumuran (*well diffusion*) (Delgado *et al.*, 2001). *S. aureus* FNCC 0047 diinokulasikan kedalam medium NA padat dan diinkubasi selama 48 jam.

Selanjutnya dituang medium NA lunak diatas medium NA padat dalam petridish dan didinginkan selama 1 jam. Setelah padat dibuat lubang sumuran dengan diameter 8 mm dengan pipet steril, pada masing-masing sumuran dimasukkan supernatan isolat BAL sebanyak 50 µl, didinginkan selama 1 jam, kemudian diinkubasi pada 30°C selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk disekitar sumuran diukur diameternya.

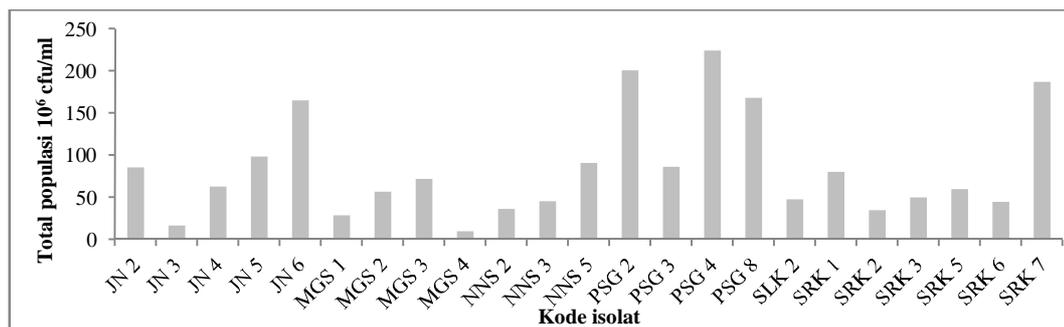
Uji konfirmasi antimikroba bakteriosin

Uji konfirmasi antimikroba penghasil bakteriosin terhadap supernatan BAL terpilih dilakukan pada suhu 100°C pada beberapa variasi waktu 15 menit, 30 menit, dan 60 menit. Setelah dipanaskan, supernatan BAL diujikan lagi kemampuannya dalam menghambat bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dengan tahap yang sama seperti pada prosedur kerja diatas. Hal ini dilakukan untuk melihat apakah masih ada aktivitas dari BAL tersebut setelah dipanaskan sehingga yang didapatkan itu benar bakteriosin dari BAL tersebut (Osmanagaoglu *et al.*, 1998). Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis deskriptif berdasarkan pengamatan zona bening yang terbentuk, kemudian data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Peremajaan Isolat BAL dan Aktivasi Isolat BAL

Peremajaan isolat BAL menggunakan media MRS menghasilkan 23 isolat BAL yang dapat diremajakan kembali. Dari 23 isolat BAL yang berhasil diremajakan kembali kemudian diaktivasi dengan metode pengenceran, tujuan aktivasi adalah untuk mendapatkan isolat yang masih menunjukkan kemampuan tumbuh yang tinggi ketika ditumbuhkan kembali setelah disimpan terlalu lama. Bakteri Asam Laktat (BAL) yang memiliki total populasi tertinggi dari masing-masing isolat buah adalah PSG4 ($22,45 \times 10^6$ cfu/ml) dan total populasi yang terendah SLK2 ($4,75 \times 10^6$ cfu/ml). Kesepuluh BAL yang mempunyai total populasi tinggi dilakukan uji selanjutnya yaitu uji penghambatan terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. PSG4 memiliki nilai aktivasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan BAL lainnya dan SLK2 yang memiliki nilai aktivasi lebih rendah dibandingkan dengan BAL lainnya (Gambar 1).



Gambar 1. Total populasi bakteri asam laktat pada media MRS agar.

Pertumbuhan BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, kandungan nutrisi, waktu inkubasi, jumlah BAL secara alami yang terdapat pada sampel buah dan sumber karbon maupun nitrogen. Dengan meningkatnya waktu inkubasi maka pertumbuhan BAL juga akan mengalami peningkatan. Peningkatan ini berlangsung secara logaritmik, meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan meningkat selanjutnya turun setelah mencapai fase stasioner (Boe, 1996).

B. Uji Kemampuan Bakteri Asam Laktat (BAL) Menghambat Bakteri Indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047

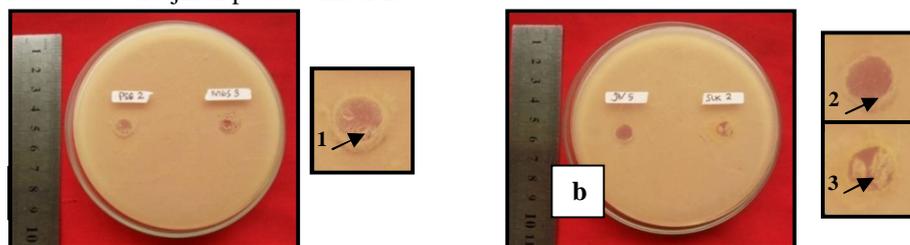
Hasil uji kemampuan BAL dalam menghambat bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047 dengan metode sumuran (*well diffusion*) diperoleh sebanyak 3 dari 10 isolat BAL mampu menghambat pertumbuhan bakteri indikator ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran. Diameter zona hambat yang terbentuk berbeda-beda dari ke-3 isolat BAL tersebut, seperti terlihat pada Tabel 1. Hal ini diduga karena bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap spesies bakteri yang bersifat sensitif.

Tabel 1. Hasil uji daya hambat bakteri asam laktat (BAL) terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047

Isolat BAL	Diameter sumur (mm)	Diameter zona hambat (mm)	Luas sumuran (Ls) mm ²	Luas zone hambat (LZ) mm ²	Volume sampel (ml)	Aktivitas bakteriosin (mm ² /ml)
PSG2	8	15,1	50,24	178,99	0,05	2575
SLK2	8	10,7	50,24	89,87	0,05	792,6
JN5	8	14,7	50,24	169,63	0,05	2387,8

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa ketiga isolat BAL menghasilkan daya hambat yang berbeda-beda terhadap bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047. Zona hambat terbesar dihasilkan oleh PSG2 (15,1 mm) dan yang terendah dihasilkan oleh SLK2 (10,7 mm). Selain itu, dapat juga terlihat bahwa aktivitas bakteriosin terbesar dihasilkan oleh PSG2 (2575 mm²/ml) dan yang terendah yaitu SLK2 (792,6 mm²/ml). Diduga kandungan dan kuantitas zat antimikroba dalam masing-masing BAL tersebut berbeda-beda sehingga menghasilkan diameter zona hambat yang berbeda pula. Rai *et al.* (2009) mengatakan kemampuan dari metabolit ekstraselular BAL membentuk zona hambat berbeda-beda tergantung dari jenis bakteri, konsentrasi bakteriosin dan kandungan nutrisi dalam media.

Hasil penelitian ini secara keseluruhan menghasilkan zona hambat yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Sarkono *et al.*, (2011). Pada penelitian Sarkono *et al.* (2011) diameter zona hambat yang dihasilkan oleh BAL yang berasal dari buah-buahan masak di Kabupaten Sleman Yogyakarta berkisar antara 10 mm–25 mm. Zona hambat tertinggi dihasilkan oleh isolat BAL yang berasal dari Pepaya 6 (25 mm) dan zona hambat terendah dihasilkan oleh Nanas 2 (10 mm). Hasil pengujian aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* FNCC 0047 disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengujian aktifitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047, (1) PSG2 positif zona hambat, (2) JN5 positif zona hambat, (3) SLK2 positif zona hambat

C. Hasil Uji Konfirmasi Antimikroba Bakteriosin

Uji konfirmasi antimikroba bakteriosin ini merupakan uji stabilitas bakteriosin terhadap suhu tinggi. Uji ini dilakukan dengan pemanasan supernatan bakteri asam laktat (BAL) pada suhu 100°C dengan variasi waktu 15 menit, 30 menit dan 60 menit, kemudian diuji lagi kemampuannya dalam menghambat bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Tabel 2 menunjukkan bahwa diameter zona hambat terbesar dihasilkan oleh PSG2 pada waktu pemanasan 30 menit (19,5 mm) dan terkecil pada waktu pemanasan 15 menit (15,6 mm), SLK2 menghasilkan zona hambat terbesar pada waktu pemanasan 60 menit (16,8 mm) dan zona hambat terkecil pada waktu pemanasan 15 menit (14,7 mm), dan JN5 menghasilkan zona hambat terbesar pada waktu pemanasan 30 menit (19,2 mm) dan zona hambat terkecil pada waktu

pemanasan 60 menit (12,8 mm). Hal ini menunjukkan bahwa yang dihasilkan oleh supernatan BAL yang berasal dari buah-buahan indigenus Riau adalah bakteriosin karena masih adanya aktivitas antimikroba setelah dilakukan pemanasan pada suhu 100°C.

Tabel 2. Hasil uji konfirmasi antimikroba bakteriosin pada pemanasan 100°C selama 15, 30 dan 60 menit terhadap bakteri indikator *S. aureus* FNCC 0047.

Isolat BAL	Diameter zona bening (mm)			Aktivitas Bakteriosin
	15 menit	30 menit	60 menit	
PSG2	15,6	19,5	16	+
SLK2	14,7	15,2	16,8	+
JN5	13	19,2	12,8	+

Hasil ini sesuai dengan penelitian Arifah *et al.* (2014), dimana bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari RK4 (Rusip Kalimantan) masih menunjukkan aktivitas antimikroba setelah diberi perlakuan panas pada suhu 50°C, 100°C dan 121°C sehingga diduga bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh RK4 adalah bakteriosin. Penelitian lainnya (Ogunbawo *et al.*, 2003) juga menyebutkan bahwa pada bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* F1 dan *L. brevis* OG1 yang masih menunjukkan aktivitas pada pemanasan 100°C selama 10-30 menit dan pemanasan pada suhu 121°C selama 10-60 menit. Masih adanya aktivitas antimikroba oleh bakteriosin ketika diberi perlakuan panas diduga karena bakteriosin merupakan peptida pendek yang stabil terhadap panas. Selain itu karena adanya asam amino tertentu pada bakteriosin tersebut yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh panas (Rahayu *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Bakteri probiotik indigenus Riau telah teruji kemampuannya dalam menghasilkan senyawa bioaktif bakteriosin. Isolat BAL yang mempunyai kemampuan tumbuh yang tinggi dengan total populasi tertinggi dihasilkan oleh PSG4 yaitu $22,45 \times 10^6$ cfu/ml dan total populasi yang terendah pada SLK2 yaitu $4,75 \times 10^6$ cfu/ml. Berdasarkan uji penghambatan BAL terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 hanya terdapat tiga isolat BAL yang menunjukkan aktivitas penghambatan yaitu PSG2, SLK2, dan JN5. Diameter zona hambat terbesar dimiliki isolat PSG2 (15,1 mm) dan terendah pada SLK2 (10,75 mm) dengan aktivitas bakteriosin berturut-turut sebesar 2575 mm²/ml dan 792,6 mm²/ml. Uji konfirmasi antimikroba pada pemanasan 100°C selama 30 menit menghasilkan zona hambat terbesar oleh isolat JN5 dan isolat PSG2 yaitu 19,2 mm dan 19,5 mm, sedangkan SLK2 menghasilkan diameter zona hambat terbesar pada pemanasan 60 menit yaitu 16,8 mm. Perlu dilakukan uji lanjut terhadap bakteriosin yang dihasilkan BAL indigenus Riau dengan uji karakterisasi bakteriosin dan uji aplikasi bakteriosin sebagai biopreservasi terhadap bahan pangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dana melalui Program Kreativitas Mahasiswa (PKM), Kepala dan Laboran Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau atas izin dan fasilitas yang diberikan selama penelitian. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada semua pihak terkait yang telah mendukung dan membantu baik secara moril maupun materil sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Antara NS. 2004. *Peranan Bakteri Penghasil Bakteriosin dalam Fermentasi Urutan*. Seminar Nasional Probiotik dan Prebiotik sebagai Makanan Fungsional. Denpasar. Bali.
- Arifah K, Fadila RA, Sakinah H. 2014. *Eksplorasi Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Asal Rusip Bangka dan Kalimantan*. Balai Besar Penelitian dan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Bar NA, Harris ND. 1987. Purification and properties of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus Bulgaricus*. *Journal of Food Science*. 32:411-215.
- Boe. 1996. Evaluation of Optimum Production of Bakteriosin from *Lactobacillus sp* JB 42 Isolation from Kimchi. *J. Microbial Biotech*. 6:63-67.

- Delgado AD, Brito, Fevereiro P, Peres C, Marques JF. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum* isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *EDP Sciences*. 81:203-215.
- Mataragas M, Drosinos EH, Metaxopoulos J. 2003. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria against *Listeria monocytogenes* in Sliced Cooked Cured Pork Shoulder Stored Under Vacuum or Modified Atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiology*. 20:259–265.
- Ogunbawo ST, Sanni AI, Onilude AA. 2003. Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* 0G1. *African Journal of Biotechnology*. 2(8):219-227.
- Osmanagaoglu O, Gunduz U, Beyatli Y, Cokmus C. 1998. Purification and characterization of Pediocin F.A bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*.F. Tr. *Journal of Biology*. 22:217-228.
- Rahayu ES, Wardani AK, Margino S. 2004. Skrining Bakteri Asam Laktat Penghasil Bacteriosin dari Daging dan Produk Olahannya. *J. Agritech*. 24(2):74-81.
- Rai AK, Bhaskar N, Amani PM, Indirani K, Suresh PV, Mahendrakar NS. 2009. Characterization and application of native lactic acid bacterium isolated from tannery fleshing for fermentative bioconversion of tannery fleshings. *Journal Application Microbiology Biotechnology*. 83:757-766.
- Sari NP. 2014. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah-Buahan di Riau [skripsi]. FMIPA Biologi Universitas Riau. Pekanbaru.
- Sarkono, Langkah S, Endang SR. 2011. Isolasi, Seleksi, Karakteristik dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bacteriosin dari Berbagai Buah Masak. Program Studi Biologi Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. *Jurnal Sains dan Sibernatika*. 19(2):223-242.
- Usmiati S, Marwati T. 2007. Seleksi dan Optimasi Proses Produksi Bacteriosin dari *Lactobacillus* sp. *Jurnal Pascapanen*. 4:27-37.