

SELEKSI GALUR- GALUR LEUCONOSTOC YANG MEMPUNYAI AKTIVITAS BAKTERIOSIN TERHADAP BERBAGAI BAKTERI INDIKATOR

Agustina Retnaningsih, Amarila Malik dan R, Maksum Radji
Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia,
Kampus UI Depok, 16424

ABSTRACT

Lactid Acid Bacteria (LAB) are known to produce bacteriocins which have antimicrobial activity, and possessed to be developed as antibiotic complement. This study aimed to characterize bacteriocins activity from Leuconostoc strains isolated previously from local sources, and to optimize pH and incubation temperature as well. A well diffusion agar assay for zone inhibition method and bacteriocin potency assay performing minimum inhibition concentration (MIC) have been done. Bacterial indicators used in this study are Leu. mesenteroides TISTR 120, and JCM 6124, Staphylococcus aureus FNCC 0047, Listeria monocytogenes FNCC 0156, Escherichia coli FNCC 0183, Pseudomonas aeruginosa FNCC 0063, Salmonella typhi FNCC 0165 and Bacillus subtilis FNCC 0061. Catalase, Trypsin and Protease K were also used for confirmation test. Results revealed that both Leu. mesenteroides MBF2-5 and MBF7-17 possessed bacteriocin activity although against Leu. mesenteroides TISTR 120 and JCM 6124 indicators strains. The optimum pH for bacteriocin potency assay for both Leuconostoc strains MBF2-5 and MBF7-17 was pH 6, whereas the optimum incubation temperature was 32°C with MIC value of 90% and 80%, respectively.

Keywords: Bacteriocin, lactic acid bacteria, Leuconostoc mesenteroides, MIC

ABSTRAK

Bakteri Asam Laktat (BAL) diketahui menghasilkan bakteriosin yang memiliki aktivitas antimikroba, dan pula memiliki potensi dikembangkan sebagai komplemen antibiotika. Penelitian ini bertujuan mengarakterisasi aktivitas bakteriosin dari galur-galur Leuconostoc hasil isolasi dari sumber-sumber lokal dari penelitian sebelumnya, serta memperoleh pH dan suhu inkubasi optimal. Penelitian dilakukan dengan cara esei penentuan zona hambatan menggunakan metode difusi agar cara sumuran dan penentuan potensinya berdasarkan metode Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Bakteri indikator yang digunakan adalah Leu. mesenteroides TISTR 120 dan JCM 6124, Staphylococcus aureus FNCC 0047, Listeria monocytogenes FNCC 0156, Escherichia coli FNCC 0183, Pseudomonas aeruginosa FNCC 0063, Salmonella typhi FNCC 0165 dan Bacillus subtilis FNCC 0061. Untuk uji konfirmasi digunakan enzim-enzim Katalase, Tripsin dan Protease K. Hasil

*Corresponding author : amarila.malik@gmail.com

mengungkapkan bahwa *Leu. mesenteroides* MBF7-17 dan MBF2-5 mempunyai aktivitas bakteriosin namun hanya menghambat bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan JCM 6124. Hasil pH optimal untuk esei potensi bakteriosin kedua *Leuconostoc* galur MBF2-5 and MBF7-17 adalah pH 6, sedangkan suhu inkubasi optimal adalah 32°C, dengan masing-masing nilai adalah 90% untuk *Leu. mesenteroides* MBF2-5 dan 80% untuk *Leu. mesenteroides* MBF7-17.

Kata kunci: bakteriosin, bakteri asam laktat, *Leuconostoc mesenteroides*, KHM

PENDAHULUAN

Bakteriosin adalah peptida antimikroba yang disintesis secara ribosomal yang dihasilkan oleh sejumlah bakteri yang dapat menghambat bakteri lain yang sekerebat hingga bakteri lain yang merusak dan bersifat patogen pada makanan (Martirani et al, 2002; Yamazaki et al, 2005). Bakteriosin pertama kali terdeteksi pada tahun 1925 oleh Andre Gratia yang mengamati pertumbuhan beberapa galur *E. coli* yang pertumbuhannya dihambat oleh senyawa antimikroba yaitu colicin. Bakteriosin dikembangkan menjadi agen antimikrobial yang diharapkan mempunyai potensi sama dengan antibiotik karena bersifat bakterisidal terhadap sebagian besar spesies bakteri patogen dan daya toksisitasnya rendah terhadap manusia dan hewan. Bakteriosin dapat diinaktivasi oleh enzim protease, memiliki pengaruh pH yang kecil pada mikrobiota usus, pada umumnya toleran terhadap pH dan panas, relatif memiliki spektrum antimikroba yang luas melawan bakteri patogen dan pembusuk. Selain itu, bakteriosin menunjukkan aktivitas bakterisidal yang umumnya beraksi pada membran sitoplasma bakteri sehingga tidak ada resistensi silang dengan antibiotik, serta determinasi genetiknya secara umum dikode oleh plasmid sehingga dapat memfasilitasi manipulasi genetik (Gálvez et al, 2007). Aktivitas an-

timikroba bakteriosin hilang atau menjadi tidak stabil dengan adanya enzim proteolitik, seperti proteinase K atau tripsin, namun bakteriosin tidak terpengaruh oleh adanya enzim katalase, lipase, fosfolipase C, lisozim, α -amilase, dekstranase, mitomicin dan sinar UV. Aktivitas antimikroba bakteriosin maksimum pada pH 2,0-6,0, dan pada pH 8,0-12,0 aktivitasnya menurun. Bakteriosin stabil pada penyimpanan selama 60 hari pada -200C, stabilitasnya menurun pada penyimpanan selama 120 hari pada 40C, dan menjadi tidak stabil (kehilangan aktivitas antimikrobanya) pada penyimpanan selama 80-120 hari pada 370C (Srionnual et al, 2007; Ogunbanwo et al, 2003). Sensitivitas antimikroba bakteriosin BAL dimodulasi oleh adanya protein imunitas bakteriosin. Bakteri penghasil bakteriosin menghasilkan protein imunitas untuk melindungi diri dari bakteriosin yang dihasilkannya, dan diidentifikasi bahwa gen penyandi bakteriosin disandikan bersamaan dengan gen imunitasnya (quorum sensing) (Oppegard et al, 2010).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh galur-galur *Leuconostoc* dilaporkan sebagai berikut; mesentericin Y105, diproduksi oleh *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*; leucocin A-VAL 187, diproduksi oleh *Leuconostoc gelidum*; carnosin 44A, diproduksi oleh *Leuconostoc*

camosum; dan leuconocin S, diproduksi oleh *Leuconostoc paramesenteroides*. Umumnya bakteriosin yang diproduksi oleh galur-galur *Leuconostoc* tidak aktif terhadap BAL lainnya, tetapi aktif terhadap *Listeria*. Leucocin C, Leucocin A dan B; ketiganya merupakan bakteriosin dari kelas IIa yang dihasilkan dari satu galur. Leucocin A-TA33a dan C-TA33a mampu menghambat *Listeria* dan beberapa bakteri asam laktat, sementara Leucocin B-TA33a mampu menghambat sesama *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Weissella*. Leucocin A-TA33a identik dengan Leucocin A-UAL 187 sehingga karakteristik molekular antara kedua bakteriosin tersebut relatif sama (Malik et al, 2007). Mesentericin Y105 yang termasuk dalam kelas IIa (non lantibiotik) (Malik et al, 2009).

Aplikasi bakteriosin yang masa kini dikembangkan sebagai komplemen antibiotik merupakan alasan kuat dilakukannya penelitian isolasi dan karakterisasi bakteriosin dari galur-galur potensial. Galur-galur *Leuconostoc* isolat lokal hasil koleksi pada penelitian sebelumnya diskrining aktivitas antimikroba terhadap berbagai bakteri indikator (Malik et al, 2010; Stiles, 1994; Hechard, 1992). Selain itu, juga diteliti suhu dan pH optimal dari galur-galur tersebut.

METODE

Bahan

Bakteri

Bakteri uji adalah galur-galur BAL koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, yaitu *Leuconostoc mesenteroides* galur MBF2-5, galur MBF3-

1, galur MBF5-4, galur MBF7-5, galur MBF7-8, galur MBF7-17, galur MBF11-2, dan galur CND12, *Leuconostoc citreum* galur MBFBJG1, galur MBFCNC8, dan galur MBFPDG15 (9, 10, 11). Bakteri Indikator yang digunakan untuk pengujian aktivitas antimikroba adalah *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120 (Bangkok MIRCEN, atas pemberian dari UICC) dan *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124 (koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas pemberian Prof. Ogasawara,, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang. *Listeria monocytogenes* FNCC 0156, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, *Salmonella typhi* FNCC 0165, dan *Bacillus subtilis* FNCC 0061.

Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah media MRS (de Man Rogosa Sharpe) (12) [Difco, USA]. Media NA (Nutrien Agar) [Difco, USA] digunakan sebagai media pemeliharaan bakteri indikator.

Cara Kerja

Penyiapan inokulum bakteri indikator

Kultur bakteri indikator diinokulasi ke dalam 5,0 mL larutan Natrium klorida fisiologis (0,9%), kemudian di vortex hingga homogen, sehingga kekeruhannya sebanding dengan larutan Mc Farland III, yaitu setara dengan 10⁹ sel bakteri/mL. Selanjutnya suspensi bakteri indikator diencerkan hingga pengenceran 100 kali yang setara dengan 10⁷ sel bakteri/mL.

Uji aktivitas substansi penghambat

Sebanyak 50 μ L kultur cair 24 jam, di sentrifugasi singkat, kemudian pelet diresuspensi. Resuspensi pelet tersebut diambil dengan jarum ose steril kemudian ditusukkan pada media agar MRS di cawan petri sebanyak 2 tusukan ditempat yang sama (13), Sebanyak 1 mL inokulum bakteri indikator 107 sel bakteri/mL dipipet kemudian dimasukkan ke dalam 4 mL media seed layer agar MRS untuk bakteri indikator galur *Leu. mesenteroides* dan media seed layer NA untuk bakteri indikator lainnya, kemudian dituang secara aseptis di atas permukaan media base layer dan dibiarkan membeku. kemudian diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan pertumbuhan masing-masing bakteri indikator selama 24 jam yaitu suhu 320C untuk *Leu. mesenteroides* TISTR 120, *Leu. mesenteroides* JCM 6124 dan suhu 370C untuk bakteri indikator lainnya. Setelah diinkubasi, zona hambatan (zona jernih) yang terbentuk diukur dengan jangka sorong kemudian dokumentasikan.

Uji aktivitas supernatant antimikroba bakteri uji terhadap bakteri indikator dengan metode difusi sumur agar Isolat BAL ditumbuhkan dalam media MRS cair 5,0 mL, kemudian divortex hingga homogen, dan setelah itu diinkubasi pada 320C selama 24 jam. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 1600 x g pada suhu 40C selama 15 menit. Filtrat dinetralkan dengan NaOH 1 N sehingga didapat pH 6,0 yang diukur dengan pH meter. Filtrat disterilkan dengan filter Millipore berdiameter 0,22 μ m ke dalam tabung steril untuk memperoleh supernatan antimikroba. Media yang dipersiapkan sebagaimana disebutkan dalam Uji aktivitas substansi

penghambat di atas ini. Setelah memadat, lubang dibuat pada media agar tersebut menggunakan sumuran logam berdiameter 6 mm dan tinggi 1 cm. Sebanyak 50 μ L supernatan antimikroba dimasukkan ke dalam sumur, kemudian didiamkan hingga meresap selanjutnya diinkubasi sebagaimana dijabarkan di atas. Setelah diinkubasi, zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong, kemudian didokumentasikan.

Optimasi produksi protein antimikroba berdasarkan waktu inkubasi BAL Optimasi waktu inkubasi dilakukan pada kultur cair selama 12, 18, 24 dan 30 jam. Setelah itu dilakukan uji aktivitas antimikroba seperti langkah di atas dan zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Zona hambatan terbesar menyatakan waktu inkubasi optimal BAL tersebut.

Uji konfirmasi aktivitas bakteriosin setelah penambahan enzim

Sebanyak 250 μ L supernatan antimikroba dicampur dengan 750 μ L enzim Protease K (Sigma) dengan konsentrasi 1 mg/mL dalam dapar pospat pH 7,5 kemudian diinkubasi selama 5 jam pada suhu 370C. Sebanyak 1 mL inokulum bakteri indikator 107 sel bakteri/mL dicampur homogen dengan 4 mL media seed layer agar MRS kemudian dituang diatas permukaan media base layer, selanjutnya dilakukan sebagaimana pada Uji aktivitas antimikroba. Prosedur tersebut juga dilakukan terhadap perlakuan dengan enzim katalase (Sigma) konsentrasi 1 mg/mL dilarutkan dalam dapar pospat pH 7,0 dan tripsin (Sigma) konsentrasi 1 mg/mL dalam dapar pospat pH 7,6 yang masing-masing diinkubasi pada suhu 250C.

Optimasi aktivitas bakteriosin terhadap pH dan suhu inkubasi

Kultur bakteri berumur 24 jam yang telah ditumbuhkan dalam media MRS cair dengan volume 5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 1600 x g pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan dibagi tiga dengan volume yang sama kedalam masing-masing tabung. Supernatan kemudian dinetralkan masing-masing dengan pH 6,0; pH 7 dan pH 8 melalui penambahan larutan NaOH 1 N kemudian diukur menggunakan pH meter. Supernatan disterilkan dengan filter Millipore berdiameter 0,22 µm ke dalam tabung steril. Kemudian dilakukan prosedur uji aktivitas dengan metode sumuran seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Setelah supernatan berdifusi sempurna, inkubasi dilakukan dengan dua suhu yaitu suhu 32°C dan 37°C masing-masing selama 24 jam. Kedua suhu ini dipilih berdasarkan kondisi kultur yang lazim dari BAL *Leuconostoc*. Setelah diinkubasi, zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong, kemudian didokumentasikan.

Penentuan aktivitas bakteriosin dengan metode Konsentrasi Hambat Minimal (KHM)

Kultur bakteri berumur 24 jam yang telah ditumbuhkan dalam media MRS cair dengan volume 5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 1600 x g pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dinetralkan hingga pH optimal berdasarkan hasil uji aktivitas dengan optimasi pH melalui penambahan larutan NaOH 1 N. Supernatan disterilkan dengan filter Millipore berdiameter 0,22 µm ke dalam tabung steril. Seri enceran duplo untuk masing-masing supernatan antimikroba dengan

konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70% dan 60%. Persiapan enceran dilakukan cara sebagai berikut, ditambahkan secara berturut-turut supernatan sebanyak 1,0 mL; 0,9 mL; 0,8 mL; 0,7 mL dan 0,6 mL kedalam tabung steril. Ditambahkan pada masing-masing konsentrasi inokulum bakteri indikator 107 sel bakteri/mL sebanyak 0,1 mL. Kemudian ditambahkan media MRS pada konsentrasi 80%, 70% dan 60% secara berturut-turut yaitu 0,1 mL, 0,2 mL dan 0,3 mL. Suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu inkubasi optimal berdasarkan hasil uji aktivitas dengan optimasi suhu inkubasi. Inkubasi juga dilakukan terhadap kontrol media MRS dan kontrol bakteri indikator menggunakan suhu inkubasi optimal

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini bakteri indikator yang digunakan seluruhnya ada 8 kultur yang mewakili bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Hasil percobaan uji aktivitas substansi penghambat yang telah dilakukan menggunakan metode tusuk maka dari sebelas galur *Leuconostoc* yang di uji yaitu *Leu. mesenteroides* MBF2-5, MBF3-1, MBF5-4, MBF7-5, MBF7-8, MBF7-17, MBF11-2, CND12, *Leu. citreum* MBFBJG1, galur MBFCNC8, dan galur MBFPDG15, semua menunjukkan adanya substansi penghambat hanya terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124. Sedangkan terhadap bakteri indikator *Listeria monocytogenes* FNCC 0156, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, *Salmonella typhi* FNCC 0165, dan *Bacillus subtilis* FNCC 0061 tidak menunjukkan hambatan (data

tidak ditampilkan). Aktivitas bakteriosin dari genus *Leuconostoc* dilaporkan berspektrum sempit, namun semestinya aktif terhadap *Listeria* (Malik et al, 2007). Substansi penghambat dari galur-galur yang digunakan kemungkinan tidak cukup kuat aktivitasnya untuk menghambat bakteri-bakteri indikator patogen yang digunakan.

Metode tusuk digunakan sebagai seleksi awal yang dilakukan terhadap bakteri asam laktat (BAL) yang berpotensi mempunyai aktivitas antimikroba. Metode ini dilakukan untuk mengetahui substansi-substansi yang dapat memberikan hambatan disebabkan senyawa peroksida, asam organik, asam-asam amino dan bakteriosin yang dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat selama fermentasi (Kusmiati & Malik, 2002). Substansi-substansi penghambat yang dihasilkan bakteri uji BAL menunjukkan zona hambat terhadap bakteri indikator yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan bakteri indikator BAL yaitu bakteri Gram positif *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.

Berdasarkan hasil penelitian dengan uji aktivitas antimikroba menggunakan metode sumuran didapatkan empat bakteri uji yang berpotensi menghasilkan bakteriosin yaitu *Leu. mesenteroides* MBF2-5, MBF7-5, MBF 7-17 dan *Leu. citreum* MBFBJG1 dengan menunjukkan adanya hambatan hanya pada bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.

Pada isolat BAL yang menunjukkan zona hambat terhadap bakteri indikator dilakukan optimasi waktu inkubasi untuk mengetahui waktu inkubasi optimal yang menghasilkan bakteriosin terbanyak.

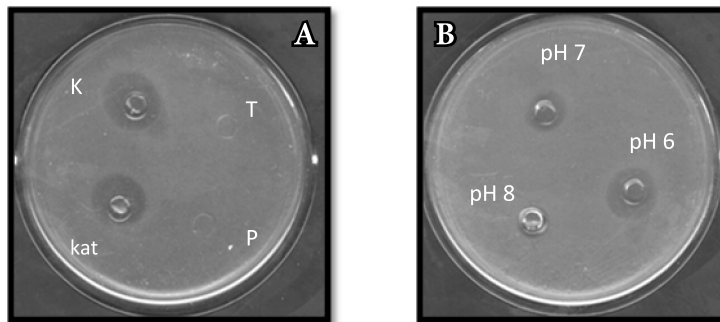
Hasil percobaan menunjukkan peningkatan diameter daerah hambatan berupa zona jernih dari waktu inkubasi 18 jam dengan suhu 320C ke waktu inkubasi 24 jam dengan suhu 320C. Sedangkan waktu inkubasi 24 jam dengan suhu 320C ke waktu inkubasi 30 jam dengan suhu 320C terjadi pengurangan ukuran zona hambat. Pada fase ini diduga aktivitas bakteriosin telah hilang karena terdegradasi, ditandai dengan hilangnya zona jernih. Produksi bakteriosin menurun setelah diinkubasi 24 jam sesuai penelitian bakteriosin yang dihasilkan dari *Streptococcus thermophilus* terhadap bakteri gram positif dimana pertumbuhan optimal dihasilkan pada akhir fase pertumbuhan yaitu dalam waktu 24 jam (Delves et al, 1996).

Empat kandidat yang dapat memberikan hambatan terhadap bakteri indikator yaitu *Leu. mesenteroides* MBF2-5, MBF7-5, MBF 7-17 dan *Leu. citreum* MBFBJG1 kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan menggunakan enzim proteolitik dan juga enzim Katalase. Berdasarkan hasil uji konfirmasi diperoleh dua galur penghasil bakteriosin yaitu supernatan *Leu. mesenteroides* MBF7-17 dan *Leu. mesenteroides* MBF2-5 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 1. Pemilihan pada dua galur tersebut berdasarkan zona jernih yang dapat diamati di lokasi sekitar sumuran yang mendapatkan perlakuan dengan enzim katalase dibandingkan kontrol supernatan yang juga menghasilkan zona jernih di sekitar sumuran sedangkan supernatan yang mendapat perlakuan dengan enzim tripsin dan protease K tidak terdapat hambatan berupa zona jernih

di sekitar sumuran. Hasil pengamatan kandidat *Leu. mesenteroides* MBF7-17 dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dilakukan uji konfirmasi dengan menggunakan enzim proteolitik yaitu Protease K dan Tripsin juga enzim Katalase seperti disajikan pada Gambar 1. Pada galur *Leu. mesenteroides* MBF7-5 dan *Leu. citreum* BJG1 terdapat hambatan berupa zona jernih pada supernatan dengan perlakuan enzim tripsin, protease K dan katalase serta pada kontrol supernatan. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa galur *Leu. mesenteroides* MBF7-5 dan *Leu. citreum* MBFBJG1 bukan merupakan kandidat penghasil bakteriosin. Hal ini berdasarkan bahwa aktivitas antimikroba dari bakteriosin yang merupakan protein alami tidak stabil atau bahkan hilang setelah diperlakukan dengan enzim proteolitik seperti protease dan tripsin sedangkan dengan adanya enzim katalase, α -amilase, lysozim dan dextran tidak akan mempengaruhi aktivitas bakteriosin. Zona jernih yang hilang akibat perlakuan dengan enzim-enzim proteolitik seperti Tripsin dan Protease K disebabkan karakteristik umum dari bakteriosin sebagai protein alami. Penambahan enzim Tripsin diperlukan untuk memperkuat uji konfirmasi karena Tripsin merupakan enzim proteolitik yang bekerja paling kuat menguraikan protein (Dover et al, 2007). BAL bersifat katalase negatif sehingga dengan adanya perlakuan dengan enzim katalase hanya merusak senyawa peroksida yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Zona jernih yang muncul dengan perlakuan enzim katalase membuktikan bahwa aktivitas antimikroba bukan disebabkan oleh senyawa peroksida. Aktivitas bak-

teriosin yang dihasilkan oleh BAL tidak dipengaruhi oleh adanya enzim katalase. Sedangkan dengan adanya penambahan enzim proteolitik (Proteinase K dan Proteinase E) menyebabkan bakteriosin menjadi inaktif (Vaughan et al, 2001). Supernatan antimikroba yang diperoleh untuk uji aktivitas dengan metode sumuran terlebih dahulu dinetralisasi dengan menambahkan NaOH. Hal ini untuk memastikan bahwa adanya hambatan terhadap bakteri indikator bukan disebabkan oleh asam organik yang dihasilkan BAL selama inkubasi (Nitisinprasert, 2000). Keempat bakteri uji yang berpotensi menghasilkan bakteriosin tersebut merupakan kelompok bakteri asam laktat genus *Leuconostoc* yang bersifat heterofermentatif yang mempunyai spektrum hambatan sempit karena hanya menghambat bakteri yang sekerabat. Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat golongan heterofermentatif memiliki spektrum yang lebih sempit dibandingkan dengan bakteriosin dari bakteri asam laktat golongan homofermentatif seperti galur *pediococci* (Ogunshe, Omotoso & Adeyeye, 2007). Galur *Leuconostoc mesenteroides* lainnya menghasilkan dua macam bakteriosin yaitu *mesenteroides* FR52 yang memiliki spektrum hambatan besar sehingga disebut anti *Listeria* karena dapat menghambat *Listeria monocytogenes* dan *mesenteroides* 52B yang hanya aktif menghambat *Leuconostoc* sp (Nitisinprasert, 2000).

Gambar 1. Uji aktivitas bakteriosin dengan metode agar difusi sumuran terhadap bakteri indikator. (A) setelah penambahan enzim (*Leu. mesenteroides* MBF7-17 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120). (B) optimasi pH (*Leu. mesenteroides* MBF2-5 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120) pada suhu optimal 320C.



Tabel 1. Uji Aktivitas Supernatan antimikroba setelah penambahan enzim terhadap bakteri indikator

Kandidat bakteriosin	Pengulangan	<i>Leu. mesenteroides</i> TISTR 120 (mm)				<i>Leu. mesenteroides</i> JCM 6124 (mm)			
		K	T	P	Kat	K	T	P	Kat
<i>Leu. mesenteroides</i> MBF2-5	Rata2	11,6	-	-	10,3	11	-	-	10,3
<i>Leu. mesenteroides</i> MBF7-17	Rata2	14,6	-	-	12,6	12,6	-	-	11,3

Kandidat *Leu. mesenteroides* MBF7-17 dan *Leu. mesenteroides* MBF2-5 menghasilkan nilai optimal hambatan pada pH 6 dan suhu inkubasi yang optimal pada suhu 320C. Hasil pengamatan seperti disajikan pada Gambar 2, Tabel 2 dan Tabel 3. Optimasi suhu inkubasi bertujuan untuk melihat pertumbuhan bakteri indikator yang optimal karena salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah suhu (Vaughan, 2001). Optimasi pH yang dilakukan bertujuan untuk melihat pengaruh pH terhadap aktivitas bakteriosin sebagai antimikroba. Aktivitas maksimal pada antimikroba terdapat pada interval pH 5-8, dan aktivitas senyawa antimikroba tersebut lebih

lebih stabil pada kondisi asam dibandingkan pada kondisi basa (Jianhua, 2009).

Dari hasil KHM di dapat KHM pada konsentrasi 80% untuk kandidat *Leu. mesenteroides* MBF7-17 terhadap bakteri indikator *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120 dan *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124. KHM pada konsentrasi 90% pada kandidat *Leu. mesenteroides* MBF2-5 terhadap bakteri indikator *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120 dan *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124. Hasil pengamatan disajikan pada gambar 3.

Tabel 2. Uji Aktivitas Bakteriosin dengan Optimasi pH dan suhu inkubasi pada *Leu. mesenteroides* MBF2-5 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124

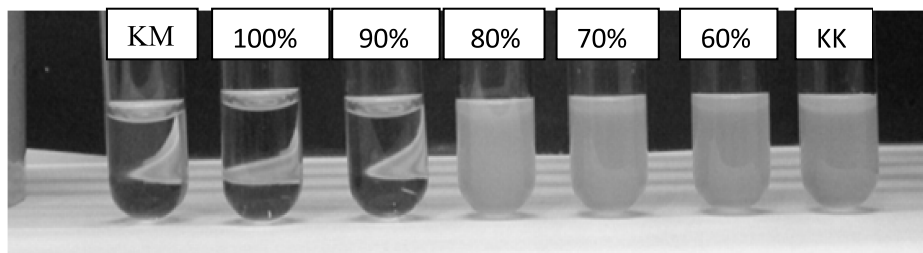
No	<i>Leu. mesenteroides</i> MBF2-5	<i>Leu. mesenteroides</i> TISTR 120		<i>Leu. mesenteroides</i> JCM 6124	
		370C	320C	370C	320C
1	pH 6	11,3	12	10	12
2	pH 7	10	10	9,3	11
3	pH 8	6,7	6,7	6,7	6,7

Keterangan : x = nilai rata-rata

Tabel 3. Uji Aktivitas Bakteriosin dengan Optimasi pH dan suhu inkubasi pada *Leu. mesenteroides* MBF7-17 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124

No	<i>Leu. Mesenteroides</i> MBF7-17	<i>Leu. mesenteroides</i> TISTR 120		<i>Leu. mesenteroides</i> JCM 6124	
		370C	320C	370C	320C
1	pH 6	15	16,6	13,3	13
2	pH 7	13,3	16	11,3	10
3	pH 8	11,6	12	6	6,7

Keterangan : x = nilai rata-rata



Gambar 3. Hasil Penentuan Potensi Aktivitas Bakteriosin dengan Metode Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) pada Kandidat *Leu. mesenteroides* MBF2-5 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 pada Suhu 32°C. KM = Kontrol Media, KK = Kontrol Kuman

Penentuan nilai KHM berguna untuk menentukan potensi aktivitas bakteriosin terhadap bakteri indikator. *Pediococcus acidilactici* menghasilkan bakteriosin yang dapat menghambat secara signifikan terhadap *Listeria monocytogenes* dengan menggunakan metode KHM. Bakteriosin

yang dihasilkan *Pediococcus acidilactici* dengan konsentrasi 500 Unit/ml terbukti dapat mereduksi *Listeria monocytogenes* dengan konsentrasi inokulum 104 sel bakteri/ml (Nielsen , Dickson, Crouse, 1990).

KESIMPULAN DAN SARAN

Leu. mesenteroides MBF7-17 dan Leu. mesenteroides MBF2-5 mempunyai kemampuan menghasilkan bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Leu. mesenteroides TISTR 120 dan Leu. mesenteroides JCM 6124 dengan aktivitas optimal pada pH 6 dan suhu inkubasi pada 32°C, serta nilai KHM masing-masing 80% dan 90%. Penelitian dilanjutkan untuk identifikasi gen bakteriosin dan gen imunitasnya dengan menggunakan PCR dan sekuensing DNA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini adalah bagian dari penelitian yang didanai oleh Third World Academy of Sciences (TWAS), Research Grant for Basic Research kepada A. Malik (RGA No. 06-335 RG/BIO/AS-UNESCO FR:3240157846. ucapkan terima kasih kepada Prof. M. Radji atas diskusi yang bermanfaat.

DAFTAR ACUAN

- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol*, 23(1):130-138
- Delves J, Blackburn, Evans, Hugenholtz. 1996. Applications of the *Bacteriocin nicin*. *A Van Leeuw*, 69:193-202
- Dover S, Aroutcheva A, Faro S, Chikindas M. 2007. Safety Study of an Antimicrobial Peptide Lactocin 160 Produced by the Vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infec Dis Obstet Gynaecol*, 1-5
- Gálvez A, Abriouel H, Lopez RL, Omar NB. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *J Food Microbiol*, 120:51-70.
- Hechard Y, Derijard B, Letellier F, Cerna-tiempo Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol*, 138: 2725-2731
- Jianhua X, Zang R, Shang C, Guo Y. 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African J Biotechnol*, 8(20): 5611-5619
- Kusmiati & Malik A. 2002. Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pba1 pada Berbagai Media. *Makara (Kesehatan)*, 6(1):1-7
- Malik A, Felicia, Radji M, Oetari A. 2007. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal Menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. *Sains Indonesia*, 1(12):1-6
- Malik A, Hermawati AK, Hestingtyas M, Soemiati A, Radji M. 2010. Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukosukrase dari Makanan dan Minuman Mengandung Gula. *Makara (Sains)*, 14(1):63-68
- Malik A, Radji M, Kralj S, Dijkhuizen L. 2009. Screening of Lactic Acid Bacteria from Indonesia Reveals Glucansucrase and Fructansucrase Genes in two Different *Weissella confuse* strains from Soya. *FEMS Microbiol Lett*, 300:131-138
- Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, De Felice M. 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact*, 1(1):1-5.

- Nielsen JW, Dickson JS, Crouse JD. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl Environ Microbiol*, 56(7): 2142-2145.
- Nitisinprasert S, Nilphai V, Bunyun P, Sukyai P, Doi K, Sonomoto K. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant Lactic Acid Bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* resistant to antibiotics. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 34: 387-400.
- Ogunbanwo ST, Sani AI, Onilude AA. 2003. Characterization of Bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J Biotechnol*, 2(8): 219-227.
- Ogunshe AA, Omotoso MA & Adeyeye JA. 2007. In vitro antimicrobial characteristic of bacteriocin producing *Lactobacillus* strains from Nigerian indigenous fermented foods. *African J Biotechnol*, 6(4): 445-453.
- Oppegard C, Emanuelsen L, Thorbek L, Fimland G, Nissen J. 2010. The Lactococcin G Immunity Protein Recognizes Specific Regions in Both Peptides Constituting the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. *Appl Environ Microbiol*, 76(4):1267-1273.
- Srionnual S, Yanagida F, Lin LH, Hsiao KN, Chen YS. Weissellicin. 2007. Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibria* 110, Isolated from Plasom, a Fermented Fish Product from Thailand. *Appl Environ Microbiol*, 73(7):1-4.
- Stiles, ME. 1994. Bacteriocins Produced by Leuconostoc Species. *J Dairy Sci*, 77: 2718-2724
- Vaughan A, Eijsink VGH, O'Sullivan TF, O'Hanlon K, Sinderen D. 2001. An analysis of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol*, 91:131-138.
- Vaughan A, Eijsink VGH, O'Sullivan TF, O'Hanlon K, Sinderen D. 2001. An analysis of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol*, 91:131-138.
- Yamazaki K, Suzuki M, Kawai Y, Inoue N, Montville T. 2005. Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl Environ Microbiol*, 71(1):554-557.