

Senyawa Antibakteri yang Diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* dan Aplikasinya untuk Pengawetan Bahan Ikan
(Antibacterial Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* and Its Application for Preserving Fish Material)

Sulistiani

Puslit Biologi LIPI, Jl. Raya Cibinong KM 46, Cibinong
Email: sulis_lipi@yahoo.com

Memasukkan: Februari 2017, **Diterima:** Juni 2017

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) generally accepted as safe microorganism and play an important role in the fermentation and preservation of food/feed. LAB is known to extend the shelf life of food/feed, because of its ability to produce antibacterial compounds such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. The objective of this study was antibacterial compounds produced by *Lactobacillus plantarum* and their application for fish preservative. The research results showed *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537] produces lactic acid from 71.16 to 77.91mg/mL, hydrogen peroxide from 0.17 to 0.25 mg/mL and producing bacteriocins indicated by the presence of the gene encoding plantaricin, an antibacterial compounds that act as food preservative. Lactic acid 1.5% and 3% salt was not able to suppress the growth of bacteria, while fermentation solution (supernatant) of *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530], chitosan 1.5% and a mixture of lactic acid 1.5% and salt 3% slightly suppress the growth of spoilage bacteria on the fish material stored 48 hours at room temperature. Treatment with fermentation solution (supernatant) of *L. plantarum* Su-ls537 able to suppress strongly growth of spoilage bacteria in fish material for 24 and 48 hours storage. At 72 hours of storage the fish material rotted, the addition of preservatives no longer able to suppress the growth of spoilage bacteria.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus plantarum*, fish, antibacterial compounds, preservation

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) umumnya dikenal sebagai organisme yang aman (GRAS) dan berperan penting di fermentasi dan pengawetan makanan/pakan. BAL dikenal mampu memperpanjang masa simpan bahan pangan/pakan, karena kemampuannya menghasilkan senyawa antibakteri seperti asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Pada penelitian ini telah dilakukan analisis kandungan senyawa antibakteri yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* dan aplikasinya untuk pengawetan bahan ikan. Hasil penelitian menunjukkan *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537] menghasilkan asam laktat 71,16-77,91 mg/mL, hidrogen peroksida 0,17-0,25 mg/mL dan memproduksi bakteriosin ditunjukkan dengan keberadaan gen pengkode plantaricin yang merupakan senyawa antibakteri yang berfungsi sebagai pengawet. Senyawa pengawet ikan yaitu asam laktat dengan konsentrasi 1,5% dan garam 3 % tidak mampu menekan pertumbuhan bakteri pembusuk, sedangkan larutan fermentasi (supernatant) *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530], khitosan 1,5%, campuran asam laktat 1,5% dan garam 3 % sedikit menekan pertumbuhan bakteri pembusuk pada bahan ikan yang disimpan selama 48 jam di temperatur ruang. Perlakuan menggunakan larutan fermentasi (supernatant) *L. plantarum* Su-ls537 mampu menekan kuat pertumbuhan bakteri pembusuk pada bahan ikan yang disimpan 24 dan 48 jam. Pada penyimpanan 72 jam bahan ikan membusuk, penambahan bahan pengawet tidak mampu lagi menekan pertumbuhan bakteri pembusuk.

Kata Kunci: bakteri asam laktat (BAL), *Lactobacillus plantarum*, ikan, senyawa antibakteri, pengawetan

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) umumnya dikenal sebagai organisme yang aman (mikroba GRAS, *Generally Recognized as Safe*), berperan penting di fermentasi makanan/pakan dan pengawetan, baik sebagai mikroflora alami ataupun mikroflora yang diberikan dalam bentuk starter (Yang *et al.* 2012). Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* dan *Streptococcus* banyak digunakan untuk pengawetan

alami karena potensinya menghasilkan senyawa antimikroba. Dari spesies tersebut mempunyai kemampuan antagonis yang kuat terhadap bakteri patogen (Zacharof & Lovit 2012; Lelise *et al.* 2014).

Efek pengawetan oleh BAL utamanya oleh karena adanya produksi asam organik yang menurunkan pH (Daeschel 1989). Selain itu BAL juga memproduksi senyawa antimikroba seperti hidrogen peroksida, CO₂, diasetil, asetaldehid, reuterin, bakteriosin dan lainnya

(Yang *et al.* 2012). Bakteriosin merupakan peptida yang disintesis di ribosom yang aktif melawan bakteri lain, ada yang berspektrum sempit (menghambat spesies yang sama) dan ada yang berspektrum luas (menghambat spesies lain). Saat ini bakteriosin asal BAL menarik menjadi kajian karena berstatus GRAS, dapat digunakan untuk mengontrol bakteri patogen dan pembusuk pada makanan/pakan sehingga berpotensi menjadi pengawet (Djadouni & Kihal 2012; Zacharof & Lovit, 2012). Bakteriosin dari BAL menarik digunakan sebagai pengawet karena berbentuk protein yang dapat dinonaktifkan oleh enzim proteolitik pencernaan, tidak toksik dan non-immunogenik, inaktif terhadap sel eukaryota dan umumnya bersifat termotoleran (Ananou *et al.* 2007).

Ikan merupakan bahan yang banyak digunakan untuk komposisi makanan dan pakan karena nilai nutrisinya yang tinggi. Namun demikian ikan merupakan bahan yang mudah sekali rusak/mengalami penurunan mutu oleh karena kerusakan biokimia maupun mikrobiologi (Ghanbari *et al.* 2013). Untuk memperpanjang masa simpan ikan, pengawetan bahan ikan yang aman menjadi hal yang penting. Pengawetan dengan menggunakan bahan kimia sintetis saat ini sudah mulai dikurangi dan ditinggalkan, beralih ke bahan alami untuk menurunkan/mengurangi dampak negatif dengan tetap menjaga nilai nutrisi dan sensorik dari bahan ikan. Pengawetan dengan produk antibakteri asal BAL menjadi hal yang menarik dilakukan karena berstatus GRAS, aman untuk dipergunakan (Zacharof & Lovit 2012). Tujuan penelitian ini dilakukan seleksi dan analisis kandungan senyawa antibakteri (asam laktat, peroksida dan bakteriosin melalui deteksi gen pengkode bakteriosin plantaricin) dari strain-strain *Lactobacillus plantarum* serta aplikasinya untuk pengawetan dan menekan pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk pada bahan ikan yang disimpan pada temperatur ruang.

BAHAN DAN CARA KERJA

BAL yang dipergunakan dalam seleksi aktivitas antibakteri terdiri 84 strain *L. plantarum* [Su-ls474 s.d. Su-ls561] yang diisolasi dari sayur asin, Tabel 1. Bakteri indikator yang digunakan dalam analisis antibakteri terdiri dari bakteri

patogen *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (PS), *Staphylococcus aureus* (SA), *Listeria monocytogenes* (LM), *Aeromonas hydrophila* (AH) dan *Bacillus cereus* (BC) yang diperoleh dari “Pusat Koleksi Mikroorganisme InaCC – LIPI” dan “Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias – Depok”. Spesies tersebut merupakan bakteri patogen dan perusak pada bahan ikan (Ghanbari *et al.* 2013).

Produksi larutan fermentasi/supernatan asal *L. plantarum* dilakukan dengan cara ditumbuhkan pada medium MRS *broth* selama 48 jam pada temperatur 37°C selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 20 menit. Larutan fermentasi / supernatan *L. plantarum* digunakan untuk analisis antibakteri.

Uji antibakteri terhadap bakteri pembusuk dan patogen menggunakan metode *Well Diffusion Test* seperti disebutkan Djadouni & Kihal (2012). Analisis antibakteri menggunakan medium *Muller Hinton Agar* 1,8% sebanyak 20 ml di setiap cawanpetri kemudian dibiarkan memadat. Medium selanjutnya ditutup dengan 5 mL media *Muller Hinton Agar* 0,8% mengandung sel mikroba indikator sebanyak $\pm 10^6$ sel/ml. Medium dibiarkan memadat dan kemudian dilubangi membentuk *well* (sumuran) dengan diameter 5 mm. Bakteri indikator yang digunakan sebelumnya ditumbuhkan 24 jam di medium *Brain Heart Infusion* pada temperatur 37°C. Supernatan *L. plantarum* sebanyak 50 μ L dimasukan kedalam sumuran, diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam kemudian diameter penghambatan (zona bening) diukur. Analisis dilakukan dengan 2 kali pengulangan.

Strain *L. plantarum* yang mempunyai aktivitas antibakteri kuat dan berspektrum luas dikarakterisasi secara fisiologi meliputi pH (4 dan 3); NaCl (4; 6,5 dan 10%); produksi gas; temperatur (8; 37 dan 45°C) pada MRS *broth* yang diinkubasi selama 24 jam. Inkubasi dilakukan di temperatur 37°C kecuali analisis pertumbuhan di temperatur rendah diinkubasi pada temperatur 8°C (Agalia & Jeevaratnam 2013).

Pengukuran kadar asam laktat dilakukan mengikuti metode titrasi. Sebanyak 25 ml larutan fermentasi (supernatan) dari *L. plantarum* ditetesi 3 tetes indikator phenoptalein kemudian dititrasi dengan NaOH 0,1N sampai warna muncul warna merah muda. Setiap ml NaOH 0,1N ekuivalen

dengan 90,08 mg asam laktat (Saranya & Hemashenpagam 2011).

Pengukuran hidrogen peroksida dilakukan dengan cara titrasi seperti yang disebutkan Saranya & Hemashenpagam (2011) dengan modifikasi. Produk fermentasi (supernatan) 1 mL diencerkan dengan akuades hingga total volume 25 ml kemudian ditambah 25 ml H₂SO₄. Selanjutnya dititrasi dengan *potassium permanganate* (KMnO₄) 0,1N sampai terjadi dekolerasi. Setiap ml KMnO₄ 0,1N ekuivalen dengan 1,701 mg H₂O₂.

Deteksi gen bakteriosin pada *L. plantarum* dilakukan dengan mengamplifikasi gen pengkode plantaricin menggunakan primer *plnA*, *plnB*, *plnD*, *plnEF*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnG*, *plnN*, plantaricin NC8, plantaricin S, dan plantaricin W. Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (Eppendorf German) dengan predenaturasi pertama pada temperatur 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada temperatur 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada temperatur 53°C selama 1 menit, dan ekstensi pada temperatur 72°C selama 30 detik. Setelah 30 siklus selesai, diikuti fase pemanjangan pada temperatur 72°C selama 5 menit dan pendinginan pada temperatur 4°C selama 20 menit. Produk PCR dielektroforesis menggunakan agarose 2% dalam TAE 1 x pada 100 V selama 30 menit (Omar *et al.* 2006).

Bahan ikan adalah ikan laut tongkol (*Euthynnus affinis*) diperoleh dari pasar tradisional. Ikan selanjutnya diambil dagingnya dipotong berukuran 3 x 3 cm. Daging ikan 200 g direbus selama 15 menit dalam 500 ml larutan pengawet: larutan asam laktat 1,5%, larutan garam 3 %, larutan khitosan 1,5 %, larutan asam laktat 1,5% + garam 3%, larutan fermentasi *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537]+garam 3%, dan air/kontrol negatif. Perlakuan dilakukan dua kali untuk pengulangan. Daging ikan yang telah direbus dengan pengawet ditiriskan kemudian disimpan di tempat terbuka pada temperatur ruang (28-30°C). Sampel ikan di *Total Plate Count* (TPC) pada jam 0, 24, 48 dan 72 jam untuk menghitung jumlah bakteri pembusuk.

Penghitungan bakteri pembusuk dilakukan mengikuti metode *Total Plate Count* (TPC) dengan pengenceran serial sampel dalam *normal saline* (0,85% w/v), dengan mengencerkan 1 gr bahan ikan yang telah diberi perlakuan dihaluskan dalam 9

ml *normal saline* (pengenceran 10⁻¹) sampai pengenceran 10⁻⁶ gr/ml. Sampel yang telah diencerkan serial diambil sebanyak 100 µl, pada pengenceran 10⁻³ - 10⁻⁶ ditumbuhkan pada medium *Nutrien Agar* (NA) menggunakan teknik tebaran permukaan kemudian diinkubasi 2 hari pada temperatur 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung untuk menentukan nilai TPC bakteri pembusuk. Penghitungan bakteri pembusuk dilakukan pada pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ pada ikan yang disimpan pada 0 dan 1 hari, pada pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵ pada ikan yang disimpan 2 hari, dan pada pengenceran 10⁻⁵ dan 10⁻⁶ pada ikan yang disimpan 3 hari.

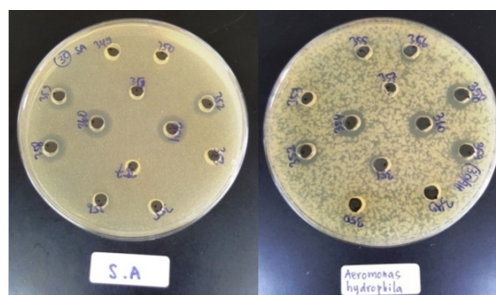
Sebanyak 1 gr bahan ikan yang telah melalui proses pengawetan selanjutnya dipanaskan dalam oven pada temperatur 105°C, sampai diperoleh berat kering yang konstan. Cara pengeringan dilakukan menggunakan aluminium foil kosong. Aluminium foil kosong ditimbang kemudian ditambah 1 g bahan ikan ditotal beratnya sebagai A (A=berat aluminium+ikan) selanjutnya dioven sampai berat keringnya konstan ditotal beratnya sebagai B (B=berat ikan kering+aluminium). Kadar air % = Berat (A-B)/berat ikan sebelum dikeringkan x 100%

Pengukuran pH bahan ikan selama proses pengawetan dilakukan dengan menggunakan pH *universal* (Merck).

HASIL

Seleksi strain *Lactobacillus plantarum* yang mempunyai aktivitas antibakteri

Hasil seleksi 84 strain *L. plantarum* asal sayur asin menunjukkan aktivitas antibakteri yang beragam (Gambar 1) (Tabel 1).



Gambar 1. Penghambatan supernatan *L. plantarum* pada bakteri patogen *S. aureus* dan *A. hydrophila* ditunjukkan dengan zona bening/zona hambat.

Tabel 1. Diameter penghambatan (mm) supernatan *L. plantarum* terhadap bakteri patogen *E. coli* (EC), *P. aeruginosa* (PS), *S. aureus* (SA), *L. monocytogenes* (LM), *A. hydrophila* (AH) dan *B. cereus* (BC).

No	Isolat	EC		BC		PS		SA		AH		LM		No	Isolat	EC		BC		PS		SA		AH		LM		
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
1	Su-ls 474	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	Su-ls 518	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	-	-	
2	Su-ls 475	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44	Su-ls 519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Su-ls 476	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	Su-ls 520	10	11	5,5	5,5	10	9	10	11	8	9	11	11	
4	Su-ls 477	8	8	-	-	-	-	-	-	7	8	8	8	46	Su-ls 521	10	10	5,5	5,5	9	8	9	9	9	9	10	10	
5	Su-ls 479	9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47	Su-ls 522	10	10	6	5,5	9	8	9	10	8	8	10	10	
6	Su-ls 480	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	48	Su-ls 523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	Su-ls 482	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49	Su-ls 524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	Su-ls 483	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	50	Su-ls 525	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
9	Su-ls 484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51	Su-ls 526	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
10	Su-ls 485	8	8	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-	52	Su-ls 527	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-	
11	Su-ls 486	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53	Su-ls 528	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
12	Su-ls 487	9	8	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	54	Su-ls 529	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
13	Su-ls 488	10	10	5,5	5,5	10	10	10	10	9	9	10	10	55	Su-ls 530	9	10	5,5	5,5	8	8	8	8	9	9	9	9	
14	Su-ls 489	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56	Su-ls 531	8	9	5,5	5,5	-	-	8	8	8	8	9	9	
15	Su-ls 490	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57	Su-ls 532	8	9	5,5	5,5	-	-	8	8	7	7	9	9	
16	Su-ls 491	8	8	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	58	Su-ls 533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	Su-ls 492	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	59	Su-ls 534	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	Su-ls 493	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	-	-	60	Su-ls 535	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	Su-ls 494	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	-	-	61	Su-ls 536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	Su-ls 495	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	62	Su-ls 537	9	10	5,5	5,5	9	9	8	8	8	9	10	10	
21	Su-ls 496	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63	Su-ls 538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	Su-ls 497	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	-	-	64	Su-ls 539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	Su-ls 498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	Su-ls 540	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	Su-ls 499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66	Su-ls 541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	Su-ls 500	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-	67	Su-ls 542	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	Su-ls 501	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	-	-	68	Su-ls 543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	Su-ls 502	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69	Su-ls 544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	Su-ls 503	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	70	Su-ls 545	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
29	Su-ls 504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71	Su-ls 546	9	8	5,5	5,5	8	8	9	9	9	7	9	9	
30	Su-ls 505	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	72	Su-ls 547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31	Su-ls 506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73	Su-ls 548	10	10	5,5	5,5	9	9	10	10	10	10	11	10	
32	Su-ls 507	10	11	5,5	5,5	9	8	9	9	9	10	10	10	74	Su-ls 549	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	Su-ls 508	10	10	5,5	5,5	8	8	9	8	9	10	10	9	75	Su-ls 550	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	
34	Su-ls 509	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	76	Su-ls 551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	Su-ls 510	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	-	-	77	Su-ls 554	10	10	5,5	5,5	8	8	11	11	10	10	10	10	
36	Su-ls 511	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78	Su-ls 555	9	9	-	-	9	8	8	8	9	9	9	9	
37	Su-ls 512	10	10	5,5	5,5	9	9	10	10	10	10	10	10	79	Su-ls 556	9	9	-	-	9	8	8	8	9	9	9	9	
38	Su-ls 513	8	9	5,5	5,5	-	-	-	-	7	7	-	-	80	Su-ls 557	9	10	-	-	9	9	9	9	10	10	9	9	
39	Su-ls 514	9	9	5,5	5,5	8	8	8	8	7	8	-	-	81	Su-ls 558	-	-	-	-	8	8	8	8	8	7	9	9	
40	Su-ls 515	10	9	5,5	5,5	8	8	10	10	9	10	10	10	82	Su-ls 559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	7	9	9
41	Su-ls 516	10	10	5,5	5,5	8	8	8	8	9	9	9	9	83	Su-ls 560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
42	Su-ls 517	9	9	5,5	5,5	8	8	8	8	7	9	9	9	84	Su-ls 561	-	-	-	-	-	-	-	-	7	6	-	-	

Keterangan: (-) tidak menghasilkan senyawa antibakteri.

Karakterisasi fisiologi pertumbuhan *L. plantarum* dengan aktivitas antibakteri kuat dan berspektrum luas

Hasil karakterisasi fisiologi pertumbuhan 25 strain *L. plantarum* dengan aktivitas antibakteri yang kuat dan berspektrum luas menunjukkan isolat tumbuh pada medium mengandung NaCl 3 & 6,5%, pada temperatur 37°C, pH 4 dan tidak menghasilkan gas, Tabel 2. Beberapa strain mampu tumbuh pada medium yang mengandung NaCl 10% dan strain Su-ls 537 mampu tumbuh di pH 3.

Hasil analisis kadar asam laktat, kadar hidrogen peroksida dan pH dalam produk fermentasi *L. plantarum*

Hasil pengukuran kadar asam laktat dan peroksida dalam produk fermentasi *L. plantarum* berkisar 67,56-72,51 mg/ml, sedangkan kadar peroksida antara 0,17-0,25 mg/ml. *L. plantarum* Su-ls520 menghasilkan asam laktat paling rendah 67,56 mg/ml dibandingkan 3 isolat lainnya dan *L. plantarum* Su-ls537 menghasilkan peroksida paling rendah 0,17 mg/ml dibandingkan 3 isolat lainnya, Tabel 3.

Tabel 2. Hasil karakterisasi fisiologi pertumbuhan strain *L. plantarum* yang dengan aktivitas antibakteri kuat pada berbagai konsentrasi NaCl, temperatur dan produksi gas.

No. Strain		NaCl (%)		Temperatur (°C)			Produksi gas	pH	
		3	6,5	10	8	37		45	4
1	Su-ls 487	+	+	-	+	+	-	+	-
2	Su-ls 488	+	+	+	+	+	-	+	-
3	Su-ls 507	+	+	-	-	+	-	+	-
4	Su-ls 508	+	+	-	-	+	-	+	-
5	Su-ls 512	+	+	+	+	+	-	+	-
6	Su-ls 513	+	+	+	+	+	-	+	-
7	Su-ls 514	+	+	-	-	+	-	+	-
8	Su-ls 515	+	+	+	+	+	-	+	-
9	Su-ls 516	+	+	+	+	+	-	+	-
10	Su-ls 517	+	+	-	+	+	-	+	-
11	Su-ls 520	+	+	-	+	+	-	+	-
12	Su-ls 521	+	+	-	-	+	-	+	-
13	Su-ls 522	+	+	+	+	-	-	+	-
14	Su-ls 530	+	+	+	+	+	-	+	-
15	Su-ls 531	+	+	+	+	+	-	+	-
16	Su-ls 532	+	+	+	+	+	-	+	-
17	Su-ls 537	+	+	+	-	+	-	+	+
18	Su-ls 546	+	+	-	-	+	-	+	-
19	Su-ls 548	+	+	+	-	+	-	+	-
20	Su-ls 554	+	+	+	+	+	-	+	-
21	Su-ls 555	+	+	+	+	+	-	+	-
22	Su-ls 556	+	+	+	+	+	-	+	-
23	Su-ls 557	+	+	+	+	+	-	+	-
24	Su-ls 558	+	+	+	+	+	-	+	-
25	Su-ls 559	+	+	+	+	+	-	+	-

Keterangan: (+) tumbuh baik, (+-) tumbuh sedikit, (-) tidak tumbuh.

Tabel 3. Hasil pengukuran kadar asam laktat dan kadar peroksida (H₂O₂) dalam produk fermentasi *L. plantarum*.

Strain	Kadar Asam Laktat (mg/mL)	Kadar H ₂ O ₂ (mg/mL)	pH
<i>L. plantarum</i> Su-ls520	67,56	0,25	3,26
<i>L. plantarum</i> Su-ls530	71,16	0,25	3,25
<i>L. plantarum</i> Su-ls537	72,51	0,17	3,21

Deteksi gen bakteriosin pada strain *L. plantarum*

Hasil deteksi gen pengkode bakteriosin menunjukkan *L. plantarum* Su-ls520 ditemukan 2 gen pengkode plantaricin (*plnN* dan Plantaricin S), *L. plantarum* Su-ls530 mempunyai 2 gen plantaricin (*plnG* dan Plantaricin S) dan *L. plantarum* Su-ls537 mempunyai 9 gen plantaricin (*plnB*, *plnD*, *plnEF*, *plnI*, *plnK*, *plnG*, *plnN*, Plantaricin S dan W) (Tabel 4). Visualisasi gen plantaricin di setiap strain *L. plantarum* dapat dilihat di Gambar 2.

Hasil aplikasi pengawetan pada bahan ikan

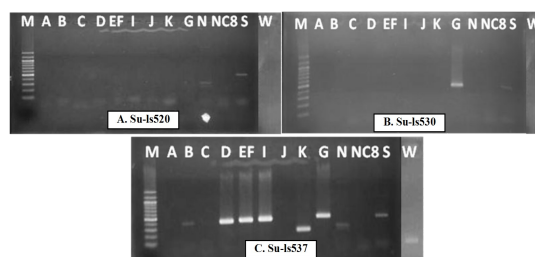
Perlakuan pengawetan pada bahan ikan menggunakan larutan fermentasi *L. plantarum* Su-ls537 menunjukkan hasil yang terbaik. Perlakuan menggunakan produk fermentasi *L. plantarum* Su-ls537 tersebut mampu menekan jumlah bakteri pembusuk dibandingkan perlakuan lainnya seperti perlakuan dengan kontrol air, kontrol garam 3%, asam laktat 1,5%, asam laktat 1,5%+garam 3%, khitosan 1,5%, dan larutan fermentasi BAL lainnya sampai 48 jam penyimpanan pada temperatur kamar (28-30°C) di kondisi terbuka/tanpa pengemasan. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai TPC bakteri pembusuk.

PEMBAHASAN

Proses pengawetan bahan pangan/pakan dapat dilakukan dengan beberapa cara, salah satunya dengan memanfaatkan bakteri yang bersifat

Tabel 4. Hasil deteksi gen plantaricin pada *L. plantarum*.

Gen plantaricin	Strain		
	Su-ls520	Su-ls530	Su-ls537
<i>plnA</i>	-	-	-
<i>plnB</i>	-	-	+
<i>plnC</i>	-	-	-
<i>plnD</i>	-	-	+
<i>plnEF</i>	-	-	+
<i>plnI</i>	-	-	+
<i>plnJ</i>	-	-	-
<i>plnK</i>	-	-	+
<i>plnG</i>	-	+	+
<i>plnN</i>	+	-	+
Plantaricin NC8	-	-	-
Plantaricin S	+	+	+
Plantaricin W	-	-	+



Gambar 2. Visualisasi gen plantaricin (A) *L. plantarum* Su-ls520, (B) *L. plantarum* Su-ls530 dan (C) *L. plantarum* Su-ls537.

antagonis terhadap bakteri pembusuk dan patogen pada bahan pangan, misalnya bakteri asam laktat. Seperti yang ditunjukkan dalam hasil penelitian, strain-strain *L. plantarum* menunjukkan aktivitas antibakteri yang beragam, ada yang menghambat semua mikroba indikator. Seperti disebutkan Ghanbari *et al.* (2013) salah satu persyaratan penting untuk menjadi pengawet, mikroba tersebut harus bersifat antagonis dan mempunyai spektrum luas terhadap bakteri dan jamur patogen dalam bahan pangan. Selain itu ada hal penting lainnya yaitu karakter fisiologi mikroba. Dari 25 strain *L. plantarum* (Tabel 2) menunjukkan karakter fisiologi beragam, ada yang mampu tumbuh di NaCl 10%, ada juga bertahan hidup di temperatur panas 45°C. Ketahanan pada temperatur panas ini sangat menguntungkan pada proses fermentasi dan produksi di skala industri (Al-Madbolly *et al.* 2015).

Lactobacillus plantarum [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537] dipilih untuk aplikasi pengawetan karena mempunyai aktivitas antibakteri yang kuat dan berspektrum luas, mampu menghambat bakteri pembusuk kelompok gram negatif dan positif. Isolat-isolat tersebut menghasilkan senyawa antibakteri yang berfungsi sebagai pengawet/biopreservatif seperti asam laktat 71,16-77,91 mg/ml, hidrogen peroksida 0,17-0,25 mg/ml dan memproduksi bakteriosin yang ditunjukkan dengan keberadaan gen plantaricin. Isolat *L. plantarum* Su-ls520 menghasilkan asam laktat 67,56 mg/ml, H₂O₂ 0,25 mg/ml dan mempunyai (2) gen plantaricin N, S; Isolat *L. plantarum* Su-ls530 menghasilkan asam laktat 71,16 mg/ml, H₂O₂ 0,25 mg/ml dan mempunyai (2) gen plantaricin G, S; isolat *L. plantarum* Su-ls537 menghasilkan asam laktat 72,51 mg/ml, H₂O₂ 0,17 mg/ml dan mempunyai (9) gen plantaricin B, D, EF, I, K, G, N, S, W.

Jumlah dan variasi senyawa antibakteri tersebut akan berpengaruh pada kekuatan pengawetan pada bahan yang diawetkan seperti bahan ikan yang diberi perlakuan. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri merupakan bersifat antibakteri. Asam akan berdisosiasi dalam sitoplasma sel sehingga menurunkan pH sitoplasma sel target. Penurunan pH ini akan menguras energi untuk menjaga keseimbangan pH intraseluler sel target selain itu penurunan pH intraseluler mengganggu fungsi sel target sehingga menyebabkan kematian sel (Saraya & Hemashenpagam 2011).

Semakin tinggi kadar asam laktat akan semakin kuat menghambat bakteri indikator, namun demikian akan mempengaruhi rasa pada bahan yang akan diawetkan sehingga perlu menjadi bahan pertimbangan lebih lanjut. Selain asam laktat, hidrogen peroksida juga bersifat antibakteri. Senyawa tersebut mengoksidasi gugus sulfhidril yang menyebabkan denaturasi enzim dan peroksidasi lipid membran yang menyebabkan peningkatan permeabilitas membran sel target. Selain itu peroksida (H₂O₂) dapat menjadi sumber radikal bebas yang bersifat bakterisidal seperti superoksida (O₂⁻) dan hidroksil (OH⁻) yang dapat merusak DNA (Ammor *et al.* 2006). Bakteriosin juga bersifat antibakteri. Mekanisme kerja bakteriosin ini dapat membentuk porus pada membran bakteri target sehingga terjadi kebocoran sel yang menyebabkan kematian sel (Ananou *et al.* 2007). Deteksi keberadaan plantaricin dapat dilakukan dengan mudah, cepat dan akurat dengan metode berbasis PCR. Dengan metode ini dapat diketahui secara langsung keberadaan gen yang mengkode plantaricin yang berperan untuk antimikroba (Yi *et al.* 2010). Plantaricin menghambat bakteri dengan spektrum luas. Kelompok plantaricin yang penting adalah plantaricin EF, plantaricin W, Plantaricin JK dan plantaricin S. Salah satu pemanfaatan *L. plantarum* penghasil plantaricin S digunakan untuk fermentasi dan mengawetkan buah zaitun (Zacharof & Lovit 2012).

Ikan yang digunakan dalam penelitian dikategorikan dalam fase *post rigor*, untuk menekan penurunan kualitas, bahan ikan diberi perlakuan dengan perebusan untuk menonaktifkan enzim ikan dan menekan pertumbuhan bakteri pembusuk. Selain itu juga diberi perlakuan dengan penambahan bermacam-macam bahan pengawet (as. laktat 1,5%, as. laktat 1,5%+garam 3%, garam 3%, khitosan 1,5%, biopreservatif asal *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537]+garam 3%).

Hasil aplikasi pengawetan dengan cara perebusan dan penambahan bahan pengawet, bahan ikan yang disimpan selama 24 jam di temperatur ruang menunjukkan hasil yaitu campuran asam laktat 1,5%+garam 3%, larutan fermentasi *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537] mampu menekan pembusukan ikan. Penghambatan bakteri pembusuk terkuat terlihat pada perlakuan menggunakan larutan fermentasi *L. plantarum* Su-ls537 ditunjukkan dengan nilai

TPC 2×10^5 cfu/g, dibandingkan kontrol negatif (air) $1,7 \times 10^8$ cfu/g. Tampaknya campuran asam laktat dan garam bersinergi mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan penambahan garam atau asam laktat saja. Dari hasil juga menunjukkan larutan fermentasi juga lebih kuat menghambat bakteri patogen, hal ini dimungkinkan campuran asam laktat, peroksida dan bakteriosin bersifat mengawetkan bahan ikan. Pada bahan ikan yang disimpan selama 48 jam, pengawet asam laktat 1,5% dan garam 3 % tidak mampu menekan pertumbuhan bakteri pembusuk, sedangkan campuran asam laktat 1,5% dan garam 3 %, khitosan 1,5%, larutan fermentasi *L. plantarum* [Su-ls520, Su-ls530] sedikit menekan pertumbuhan bakteri pembusuk. Perlakuan larutan fermentasi *L. plantarum* Su-ls537 mampu menekan pertumbuhan bakteri pembusuk ditunjukkan dengan nilai TPC bakteri pembusuk 7×10^6 cfu/g dibandingkan dengan kontrol negatif (air) nilai TPC lebih dari 3×10^9 cfu/g, Tabel 5. Seperti disebutkan oleh Zacharof and Lovit (2012) plantaricin yang berperan penting sebagai preservatif adalah plantaricin EF, plantaricin W, Plantaricin JK dan plantaricin S, dalam hal ini *L. plantarum* Su-ls537 mempunyai gen bakteriosin yang lebih banyak (plantaricin EF, W dan S) sehingga mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih kuat dan mampu

memperpanjang masa simpan bahan ikan dibanding dengan perlakuan dengan isolat yang lainnya. Pada penyimpanan 72 jam, bahan ikan sudah membusuk, hal ini menunjukkan proses perebusan dan penambahan bahan pengawet tidak mampu lagi menekan pertumbuhan bakteri pembusuk. Pertumbuhan bakteri pembusuk tersebut karena 3 hal yaitu kadar air bahan ikan yang tinggi 43,5 -71,8% (Tabel 6), temperatur penyimpanan yang hangat 28-30°C, yang merupakan temperatur optimum pertumbuhan mikroba, dan ikan sendiri merupakan sumber nutrisi yang baik untuk pertumbuhan mikroba (Tuara 1997).

KESIMPULAN

Lactobacillus plantarum [Su-ls520, Su-ls530, Su-ls537] menghasilkan senyawa antibakteri: asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Isolat *L. plantarum* Su-ls520 menghasilkan asam laktat 67,56 mg/ml, H_2O_2 0,25 mg/ml dan mempunyai (2) gen plantaricin N, S; Isolat *L. plantarum* Su-ls530 menghasilkan asam laktat 71,16 mg/ml, H_2O_2 0,25 mg/ml dan mempunyai (2) gen plantaricin G, S; isolat *L. plantarum* Su-ls537 menghasilkan asam laktat 72,51 mg/ml, H_2O_2 0,17 mg/ml dan mempunyai (9) gen plantaricin B, D, EF, I, K, G, N, S, W. Hasil aplikasi pengawetan menunjukkan larutan fermentasi *L. plantarum* [Su-

Tabel 5. Hasil penghitungan bakteri pembusuk pada sampel bahan ikan yang telah melalui proses pengawetan dengan produk fermentasi BAL yang disimpan selama 3 hari pada temperatur ruang (28-30°C).

Lama penyimpanan	Air	Garam 3%	Asam laktat 1,5%	As. laktat 1,5%+garam 3%	Khitosan 1,5%	Su-ls 520+garam 3%	Su-ls 530+garam 3%	Su-ls 537+garam 3%
Jam 0	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
Jam 24	$1,7 \times 10^3$	9×10^7	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	1×10^6	2×10^5
Jam 48	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	5×10^7	$8,3 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	7×10^6
Jam 72	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$	$>3 \times 10^9$

Tabel 6. Hasil pengukuran pH dan kadar air bahan ikan yang telah melalui proses pengawetan yang disimpan selama 3 hari pada temperatur ruang (28-30°C).

No	Perlakuan dengan pengawet	pH	Kadar air selama penyimpanan (jam)			
			0	24	48	72
1	Air (kontrol negatif)	6	65.9	62.8	58.9	52.4
2	As. laktat 1,5%	4	71.8	59.6	55.9	55.7
3	As. laktat 1,5%+garam 3%	5	64.8	60.5	57.2	47.2
4	Garam 3%	6	64	55.5	53.9	43.5
5	Khitosan 1,5%	5	67.8	61.5	60.8	52
6	<i>L. plantarum</i> Su-ls520+garam 3%	5	67.7	58.3	57.4	53.7
7	<i>L. plantarum</i> Su-ls530+garam 3%	5	65.2	59.1	53.9	44
8	<i>L. plantarum</i> Su-ls537+garam 3%	5	63.3	63.1	58.9	52.7

ls520, Su-ls530, Su-ls537] dan campuran asam laktat 1,5%+garam 3%, mampu menekan pembusukan bahan ikan dengan penyimpanan 24 jam. Perlakuan larutan fermentasi *L. plantarum* Su-ls537 mampu menekan pertumbuhan bakteri pembusuk pada bahan ikan yang disimpan selama 48 jam. Hal ini dimungkinkan karena *L. plantarum* Su-ls537 mempunyai gen bakteriosin yang lebih banyak sehingga memproduksi bakteriosin dan aktivitas antibakterinya lebih kuat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ungkapan terima kasih kami sampaikan kepada Rini Handayani, S.Si. selaku KSK DIPA tematik Pusat Penelitian Biologi LIPI dengan judul dan staf Bidang Mikrobiologi yang tidak langsung membantu terlaksananya penelitian kami. Dana penelitian ini berasal dari dana DIPA Pusat Penelitian Biologi LIPI tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Agalia, P.J. & K. Jeevaratnam. 2013. Molecular characterization of lactobacilli isolated from fermented idli batter. *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (4): 1199-1206.
- Ammor, S., G. Tauveron, E. Dufour & I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility I-screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454-461.
- Ananou, S., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno & E. Valdivia. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. Dalam: Méndez-Vilas, A. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. FORMATEX*. 475-486.
- Daeschel MA. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food technology* 43:164-167.
- Djadouni, F. & M. Kihal. 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in food. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(3): 435-443.
- Ghanbari, M., M. Jami, K.J. Domig & W. Kneifel. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Science and Technology* 54(2): 315–324.
- Lelise, A., G. Belaynesh, M. Mulubrhan, S. Kedija, B. Endashaw & B. Abebe. 2014. Isolation and screening of antibacterial producing lactic acid bacteria from traditionally fermented drinks (“Ergo and Tej”) in Gondar town, Northwest Ethiopia. *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology* 1(3): 18-22.
- Omar, NB., H. Abriouel, R. Lucas, M. Martinez-Canamero, JP. Guyot, & A. Galvez. 2006. Isolation of bacteriogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 112: 44-50.
- Saranya, S. & N. Hemashenpagam. 2011. Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria from fermented dairy product. *Pelagia research library advances in applied science research* 2(4): 528-534.
- Tuara, P. 1997. Practical methods for preserving seafoods salting and drying. *Pasifika Communication Ltd collaboration with SPC women’s Fiseheris Development Project*: 1-33.
- Yang, E., L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette & S. Fillmore. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurt. *AMB Express* 2(48): 1-12.
- Yi, H., L. Zhang, Y. Tuo, X. Han & M. Du. 2010. A novel method for rapid detection of class IIa bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Control* 21(4): 426-430.
- Zacharof, MP. & RW. Lovitt. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. 3rd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012). Bangkok, Thailand April 7-8, 2012. 2: 50-56.
- Al-Madboly, LA. & AK. Abdullah. 2015. Potent antagonistic activity of Egyptian *Lactobacillus plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens. *Frontiers in Microbiology* 6(347):1-11.