

**PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI SENYAWA PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885**

**THE EFFECT OF pH VARIATION ON ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF BIOACTIVE PEPTIDE COMPOUNDS
FROM BACTERIA *Lactobacillus fermentum* NBRC
15885**

**FAHRUL RAMADAN
N111 16 039**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**



Optimization Software:
www.balesio.com

**PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI SENYAWA PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885**

**THE EFFECT OF pH VARIATION ON ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF BIOACTIVE PEPTIDE COMPOUNDS
FROM BACTERIA *Lactobacillus fermentum* NBRC
15885**

**FAHRUL RAMADAN
N111 16 039**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**



Optimization Software:
www.balesio.com

**PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SENYAWA PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI *Lactobacillus*
fermentum NBRC 15885**

**THE EFFECT OF pH VARIATION ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF
BIOACTIVE PEPTIDE COMPOUNDS FROM BACTERIA *Lactobacillus*
fermentum NBRC 15885**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**FAHRUL RAMADAN
N111 16 039**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**



PERSETUJUAN

**PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SENYAWA PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI *Lactobacillus
fermentum* NBRC 15885**

FAHRUL RAMADAN

N111 16 039

UNIVERSITAS HASANUDDIN

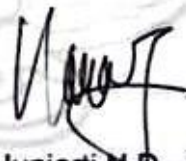
Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt.
NIP. 19500817 197903 1 003



Nana Juniarti N.D., S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19900602 201504 2 002

Pada tanggal, 10 Juni 2020



SKRIPSI

THE EFFECT OF pH VARIATION ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY
OF BIOACTIVE PEPTIDE COMPOUNDS FROM BACTERIA
Lactobacillus fermentum NBRC 15885

PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SENYAWA PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI *Lactobacillus*
fermentum NBRC 15885

Disusun dan diajukan oleh:

FAHRUL RAMADAN
N111 16 039

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 10 Juni 2020 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt.
2. Sekretaris : Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., Apt.
3. Anggota : Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
4. Anggota : Dra. Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt.



Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Subehan, S.Si, M.Pharm., Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19750925 200112 1 002



Optimization Software:
www.balesio.com

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 10 Juni 2020

Yang menyatakan,



Fahrul Ramadan
N111 16 039



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah *shubhanahu wata'ala* yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "Pengaruh Variasi pH Terhadap Aktivitas Antibakteri Senyawa Peptida Bioaktif dari Bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885".

Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana (S1) pada Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada. Demi kesempurnaan skripsi ini, penulis sangat mengharapkan dukungan dan sumbangsih pikiran baik berupa saran maupun kritikan yang bersifat membangun.

Skripsi ini penulis persembahkan kepada kedua orang tua ayahanda Parkissing dan ibunda Roslanier yang tiada henti memberikan motivasi, kasih sayang, dukungan, dorongan dan nasihat seta doa tulus ikhlas yang tentu takkan bisa penulis balas.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti secara khusus mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu sehingga dalam penyusunan skripsi ini segala

kendala yang ada dapat diselesaikan. Peneliti banyak menerima an, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak yang



bersifat moral maupun material. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Penasehat Akademik yang telah memberikan banyak nasihat dan arahan dari awal semester hingga akhir semester selama menempuh pendidikan di Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt. selaku pembimbing utama (ketua) dan Ibu Nana Juniarti, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama (sekretaris) yang telah meluangkan waktu memberi dukungan, saran, arahan dan bimbingannya selama penyusunan dan penulisan skripsi.
3. Ibu Dr. Herina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan koreksinya sebagai penguji dalam penyempurnaan penulisan dan penyusunan skripsi ini.
4. Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan dan mengajarkan banyak ilmu, membagi pengalaman yang bermanfaat kepada penulis selama masa perkuliahan dan ijin dalam penyusunan skripsi ini.
5. Bapak-bapak dan Ibu dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang

yang sangat bermanfaat selama masa perkuliahan.



6. Ibu Haslia, S.Si, selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu penulis selama penelitian hingga selesai.
7. Teman Angkatan 2016 (NEOSTIGMINE) yang telah memberi dukungan kepada penulis dan berjuang bersama selama menempuh program Sarjana (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
8. Teman-teman Keluarga Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin (KEMAFAR-UH) yang telah membantu dan memberikan banyak ilmu dan pengalaman
9. Teman-teman asisten micro crew yang telah berbagi ilmu dan pengalaman selama di Laboratorium Mikrobiologi.
10. Teman-teman penelitian peptida aktif yaitu Rima Magfirah, Andi Ainun Nuzulia, dan Siti Nurkhalishah Ramlan yang telah berjuang bersama dan membantu selama proses penelitian dan penyusunan skripsi
11. Kakanda Afdil Viqar Viqhi, S.Si., Apt. dan Kakanda Muslim, S.Si., Apt. yang selalu memberikan motivasi dan dorongan dalam penulisan skripsi.
12. Dini Ayu Zhafira yang telah membantu dan memberikan semangat dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini

Rasa hormat dan terima kasih bagi semua pihak atas segala dukungan dan doanya semoga Allah *shubhanahu wata'ala* membalas segala kebaikan

yang mereka berikan kepada penulis. Kiranya skripsi ini dapat memberikan manfaat dan masukan bagi pembaca.



Makassar, 10 Juni 2020

Fahrul Ramadan



ABSTRAK

FAHRUL RAMADAN. *Pengaruh Variasi pH Terhadap Aktivitas Antibakteri Senyawa Peptida Bioaktif Dari Bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885*

Faktor pH sangat berperan penting terhadap produksi dan aktivitas senyawa peptida bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Senyawa peptida bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat memiliki efek bakterisida bagi mikroorganisme lain. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh variasi pH media fermentasi terhadap aktivitas antibakteri senyawa peptida bioaktif dari *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885. Media terbaik untuk pertumbuhan bakteri indikator sensitif adalah media MRS. Fermentasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 25°C dengan menggunakan medium fermentasi dengan variasi pH pada pH 4, pH 7 dan pH 9 kemudian dilanjutkan dengan purifikasi dengan penambahan amonium sulfat kejenuhan 80%. Dilanjutkan dengan proses dialisis menggunakan membran selofan hingga didapatkan senyawa peptida bioaktif lalu kadar protein ditentukan. Digunakan metode difusi agar untuk menentukan nilai AU (*Activity Unit*) dengan menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar diberikan oleh peptida hasil fermentasi media pH 4 (400 AU/mL), dengan kadar sebesar 2,19 mg/mL.

Kata kunci: Variasi pH, peptida bioaktif, bakterisida, *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885



ABSTRACT

FAHRUL RAMADAN. *The Effect Of pH Variation On Antibacterial Activity of Bioactive Peptide Compounds From Bacteria Lactobacillus fermentum NBRC 15885*

Acidity is a very important factor for the production and activity of bioactive peptide compounds produced by lactic acid bacteria. Bioactive peptide compounds produced by lactic acid bacteria have a bactericidal effect on other microorganisms. The purpose of this study was to determine the effect of fermentation media pH variations on the antibacterial activity of bioactive peptide compounds from *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885. The best media for the growth of sensitive indicator bacteria is MRS media. Fermentation was carried out for 24 hours at 25°C using a fermentation medium with variation of pH at 4, 7 and 9 then followed by purification using addition of ammonium sulfate 80% saturation. Continued with dialysis using a cellophane membrane to obtain bioactive peptide compounds then the protein content was determined. Agar diffusion method was used to determine the value of AU (Activity Unit) using the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results of study showed that the greatest antibacterial activity was given by the peptide fermented media pH 4 (400 AU/mL), with levels of 2,19 mg/mL.

Keywords: pH variation, bioactive peptide, bactericide, *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885



DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Bakteri Asam Laktat	4
II.2 Media Tumbuh Bakteri Asam Laktat	7
II.3 Antimikroba	8
II.4 Sintesis dan Purifikasi Peptida Bioaktif	9
II.5 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Peptida Aktif	15



	Halaman
II.6 Purifikasi dan Dialisis Senyawa Peptida Aktif	16
II.7 Uji Aktivitas Antimikroba	18
II.7.1 Metode Difusi	18
II.7.1.1 Metode <i>disc diffusion</i> (test Kirby & Bauer)	18
II.7.1.2 <i>E-test</i>	18
II.7.1.3 <i>Ditch-plate technique</i>	19
II.7.1.4 <i>Cup-plate technique</i>	19
II.7.1.5 <i>Gradient-plate technique</i>	19
II.7.2 Metode Dilusi	20
II.7.2.1 Metode dilusi cair/ <i>broth dilution test (serial dilution)</i>	20
II.7.2.2 Metode padat/ <i>solid dilution test</i>	20
BAB III METODE KERJA	21
III.1 Alat dan Bahan	21
III.2 Metode Penelitian	21
III.2.1 Pembuatan Starter	21
III.2.2 Fermentasi Bakteriosin	22
III.2.3 Purifikasi Bakteriosin	22
III.2.3.1 Purifikasi Protein	23
III.2.3.2 Uji Aktivitas Antimikroba	23



	Halaman
III.3 Analisis Data, Pembahasan dan Kesimpulan	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V PENUTUP	31
V. 1 Kesimpulan	31
V. 2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	36



DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil analisis larutan sampel untuk penetapan kadar protein	28
2. Konsentrasi akhir amonium sulfat	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Hasil produksi peptida aktif	26
2. Hasil purifikasi peptida aktif	27
3. Hasil dialisis senyawa peptida aktif	27
4. Hasil uji protein dengan uji biuret	28



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Penelitian	36
2. Hasil Analisis Protein	37
3. Perhitungan Nilai AU (<i>Activity Unit</i>)	38
4. Konsentrasi Akhir Amonium Sulfat	39
5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri	40
6. Dokumetasi Penelitian	44



BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penggunaan bahan pengawet kimia (*food additive*) seperti kalium sorbat, natrium benzoat dan natrium fosfat biasa digunakan untuk olahan pangan, namun penggunaan bahan tersebut dapat membahayakan, jika dosis yang digunakan tidak tepat. Maka diperlukan alternatif yang dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme yang lebih alami dan aman. Maka, digunakan senyawa alami yaitu metabolit yang dihasilkan dari bakteri asam laktat (BAL). Metabolit ini memiliki aktifitas sebagai antimikroba sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pengawet alami (Pezeshk *et al.* 2015; Gokoglu *et al.* 2018).

Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri patogen (Usmiati, 2012). Salah satu senyawanya yaitu bakteriosin yang merupakan senyawa peptida bioaktif. Bakteriosin merupakan suatu senyawa protein

bobot molekul kecil dan memiliki aktivitas sebagai antimikroba dan bakteriostatik (Diop *et al.*, 2007). Penggunaan peptida aktif sebagai



bahan pengawet tidak bersifat toksik dan mudah mengalami biodegradasi karena merupakan senyawa protein yang tidak membahayakan mikroflora yang terdapat di usus, serta mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan (Suardana *et al.*, 2007).

Pertumbuhan dan produksi optimal peptida aktif tergantung pada berbagai faktor seperti pH, suhu, konsentrasi NaCl dan sumber karbohidrat (Kumar, M. *et al.*, 2105). Parameter pH memerankan peran penting dalam pertumbuhan mikroorganisme, variasi pH dalam sitoplasma dapat menghambat aktivitas enzim dan menyebabkan perubahan eksternal seperti ionisasi nutrisi molekul yang menyebabkan pengurangan produksi bakteriosin (Motta As and Brendelli, 2007). Berdasarkan percobaan Chatterjee *et al.* (2018) produksi maksimum bakteriosin dengan menggunakan bakteri *Lactococcus lactis* JC10 pada pH 6,8 menunjukkan aktivitas 3.200 AU/ml, pada pH sedikit asam yaitu pH 4,5 produksi bakteriosin menurun menjadi 1.400 AU/m kemudian pada pH yang cukup basa yaitu pada pH 12,5 terjadi penurunan tajam dalam aktivitas bakteriosin yaitu 800 AU/ml.

Salah satu jenis BAL yang telah diteliti dapat menghasilkan bakteriosin yaitu bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 yang diisolasi dari produk dangke. Bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 menunjukkan aktivitas da terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* an Asri, 2018). Namun, optimasi proses produksi, terkhusus pada pH media belum pernah dilakukan.



Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh modifikasi keasaman media pertumbuhan terhadap aktivitas bakteriosin yang dihasilkan bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh variasi pH media fermentasi terhadap produksi dan aktivitas antibakteri senyawa peptida bioaktif dari bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh variasi pH media fermentasi terhadap produksi dan aktivitas antibakteri senyawa peptida bioaktif dari bakteri *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri gram positif yang memiliki bentuk bulat atau batang, tidak memiliki spora, berkatalase negatif dan memiliki kemampuan mengubah karbohidrat menjadi asam laktat. Bakteri ini bermanfaat untuk mengawetkan makanan atau minuman, serta menghasilkan asam laktat dari metabolisme gula (bakteri homofermentatif) dan asam asetat, asam-asam volatil lainnya, karbon dioksida (CO₂) (bakteri heterofermentatif), serta bakteriosin (Korhonen, 2010).

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam produk pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga disebut sebagai *food grade microorganism* atau dikenal sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak membahayakan kesehatan. Bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai bahan pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungannya dan mengeksresikan senyawa lainnya seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), diasetil, karbon dioksida (CO₂), asetaldehid, d-isomer, asam asam amino dan bakteriosin (Kusmiati dan Malik, 2002).



Bakteri asam laktat dikelompokkan menjadi 2 kelompok (Prescott *et al.*, 2002) sebagai berikut :

1. Bakteri homofermentatif

Bakteri homofermentatif yaitu glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh: *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.

2. Bakteri heterofermentatif

Bakteri heterofermentatif yaitu glukosa difermentasikan menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂

Pada umumnya BAL terdiri atas beberapa genus bakteri yang termasuk famili *Firmicutes*, yang terdiri dari 20 genus yaitu genus *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactospaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella*. *Lactobacillus* merupakan genus terbesar dalam kelompok bakteri asam laktat dengan hampir 80 spesies berbeda dan dapat menghasilkan senyawa bakteriosin yaitu senyawa yang dapat mengambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Axelsson, 2004).

Salah satu jenis bakteri asam laktat yang termasuk dalam kategori bakteri probiotik yaitu *Lactobacillus fermentum*, dikarenakan dapat hidup pada saluran pencernaan manusia dan cenderung tahan terhadap an yang bersifat asam bahkan pada pH ekstrem yaitu pH 3 dan menstimulasi enzim pada saluran pencernaan dan menstimulasi



pengeluaran garam empedu. Bakteri *L. fermentum* dapat menghambat beberapa bakteri patogen lain *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. flexneri*, dan *S. typhimurium*. *L. fermentum* (Bao *et al.*, 2010). Dilaporkan bahwa beberapa strain *L. fermentum* juga memiliki ketahanan terhadap garam empedu hingga konsentrasi 0,3-2,0% (Mikelsaar dan Zilmer, 2009). *L. fermentum* dapat hidup dengan atau tanpa adanya bantuan oksigen (anaerob fakultatif). USFDA (*United States Food and Drug Administration*) mengakui bahwa *L. fermentum* sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) atau makanan yang aman dikonsumsi dalam jumlah yang cukup tinggi (lebih dari 10¹¹ cfu/ml) dan tidak menimbulkan efek kesehatan lainnya. *L. fermentum* juga memiliki efek antimikroba yang tinggi terhadap patogen seperti EPEC, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella sonnei* (Songisepp *et al.* 2004). Bakteri *L. fermentum* termasuk ke dalam golongan bakteri asam laktat heterofermentatif dikarenakan selain menghasilkan asam laktat, juga dihasilkan asam asetat, asam suksinat, CO₂, bakteriosin, dan H₂O₂ yang dapat bersifat sebagai antimikroba dan *L. fermentum* merupakan bakteri yang tidak membentuk spora (Songisepp *et al.*, 2004). Secara *in vitro* maupun *in vivo* bakteri *L. fermentum* telah diuji terhadap hewan coba tikus sebanyak 21 ekor, terbukti memiliki potensi sebagai probiotik karena memiliki aktivitas mikrobial dan immunomodulatory (Zoumpopoulou *et al.* 2008).

Lactobacillus plantarum dan *L. fermentum* merupakan strain bakteri

ktat yang berpotensi sebagai probiotik yang berhasil diisolasi dari dangke. Dangke merupakan pangan tradisional yang berasal dari



Enrekang Sulawesi Selatan terbuat dari susu kerbau atau susu sapi dengan penambahan getah pepaya untuk menggumpalkan kasein (Fatmawati dkk., 2015). Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Djide dan Asri (2018), berhasil mengisolasi bakteriosin dari *L. fermentum* NBRC 15885 dengan uji aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan aktivitas bakterisida. Bakteri ini merupakan bakteri gram positif, tidak memiliki spora, serta mampu memfermentasikan glukosa, maltosa, fruktosa, sukrosa kecuali mannitol. Bakteri *L. fermentum* NBRC 15885 mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang diduga bakteriosin yang memiliki aktivitas sempit pada bakteri gram positif.

II.2 Media Tumbuh Bakteri Asam Laktat

Pada umumnya medium selektif yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat (BAL) yaitu media MRSA (*De Mann Rogosa Sharpe Agar*) dan MRSB (*De Mann Rogosa Sharpe Broth*). BAL pada medium susu menggunakan starter utama berupa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus shelveiticus*, *Leuconostoc* spp. dan *Streptococcus thermophilus*. Beberapa starter non-BAL umumnya ditemukan pada fermentasi susu dengan suhu tinggi seperti *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus salivarius* (Briggiler-Marco et al., 2007).

Pada umumnya BAL dapat tumbuh pada suhu 5 - 45°C dan toleran pada kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada Pertumbuhannya optimum BAL yaitu pada pH 5,5 – 6,5 dan



mempunyai kebutuhan nutrisi kompleks, seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan karbohidrat. Selain itu, BAL memproduksi sejumlah kecil senyawa organik yang memberikan aroma dan flavor pada produk hasil fermentasinya (Axelsson, 2004).

II.3 Antimikroba

Senyawa antimikroba merupakan suatu senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Pada umumnya senyawa antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang), germisidal (menghambat germinasi spora bakteri), dan lain sebagainya (Fardiaz, 1992).

Berikut ini merupakan mekanisme penghambatan mikroba oleh senyawa antimikroba antara lain disebabkan oleh: (1) merusak dinding sel mikroba, (2) mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan terjadinya kebocoran nutrisi dari dalam sel, (3) denaturasi protein sel, dan (4) menghambat kerja enzim intraseluler (Pelczar dan Chan, 2008).

Kemampuan suatu senyawa antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain: pH substrat, umur bakteri, suhu dan waktu inkubasi. Bakteri asam laktat

dipengaruhi oleh pH, pH yang sesuai diperlukan untuk produksi antibakteri.

Di lingkungan dengan pH substrat rendah maka banyak H^+ yang terbebas ke dalam



substrat dan menempel pada membran. Semakin tinggi pH substrat maka banyak OH^- yang terbebas ke dalam substrat dan menempel pada membran. Hal ini menyebabkan sisi aktif enzim berubah keadaan ini akan mengganggu permeabilitas membran dan menghambat produksi antibakteri (Pelczar dan Chan, 1986).

Umur bakteri juga sangat mempengaruhi produksi antimikroba, umur bakteri yang tidak sesuai menyebabkan kemampuan bakteri menyerap nutrisi berkurang sehingga permeabilitas membran terganggu. Umur bakteri yang sesuai dapat memproduksi banyak antibakteri secara optimal. Faktor suhu juga mempengaruhi produksi antimikroba, suhu yang sesuai akan mempengaruhi banyak produksi antibakteri. Suhu bakteri yang sesuai dapat dilihat dengan besarnya zona hambat. Sedangkan waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi senyawa antibakteri seperti bakteri asam laktat memerlukan waktu inkubasi optimum selama 48 jam atau 3 hari untuk memproduksi banyak antibakteri (Pelczar dan Chan, 1986).

II.4 Senyawa Antimikroba BAL

Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat, hidrogen peroksida (H_2O_2), diasetil, karbon dioksida (CO_2) dan bakteriosin. (Ouwehand and Vesterlund, 2004).

Asam laktat, asam asetat dan asam propionat dihasilkan pada proses fermentasi heterofermentif, senyawa ini memiliki aktivitas pada pH rendah

ng pH netral. Asam asetat adalah inhibitor terkuat dan aktivitas nbatanya luas yaitu terhadap khamir, kapang dan bakteri. Asam



propionat memiliki aktivitas hambat kuat terhadap khamir dan kapang (Ouwehand and Vesterlund, 2004). Asam laktat dan asam asetat termasuk asam lipofilik yang dapat berpenetrasi langsung ke dalam dinding sel mikroba ketika dalam bentuk tidak terdisosiasi. Asam akan terdisosiasi menghasilkan ion hidrogen pada keadaan pH intraseluler yang tinggi, hal ini akan mengganggu proses metabolisme yang penting seperti translokasi substrat fosforilasi oksidatif (Naidu dan Clemens, 2002).

Bakteri asam laktat juga menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui proses oksidasi NADH, oksidasi flavoprotein dan superoksida dismutase. Akumulasi H_2O_2 terjadi apabila bakteri asam laktat tidak menghasilkan katalase karna tidak tersediaaya sumber heme. Efek bakterisidal H_2O_2 dikarenakan efek oksidasi kuat terhadap sel bakteri, sel protein kelompok *sulfhydryl*, dan lipid membran dapat teroksidasi. Selain itu, beberapa H_2O_2 menghasilkan reaksi penangkapan O_2 (*oxygen scavenger*) sehingga menciptakan kondisi anaerobik yang tidak diinginkan oleh organisme tertentu (Ouwehand and Vesterlund, 2004).

Diasetil (2,3-butanedione) dapat diproduksi berlebih jika terjadi metabolisme sitrat. Sitrat dapat diubah menjadi diasetil melalui piruvat. Diasetil bekerja efektif pada pH dibawah 7 dan aktivitas terhadap bakteri gram negatif, khamir dan kapang. Mekanisme kerja diasetil yaitu bereaksi dengan protein pengikat arginin pada bakteri gram negatif, hal ini batkan bakteri gram negatif mengalami kekurangan arginin and dan Vesterlund, 2004).



Bakteri asam laktat juga menghasilkan karbondioksida (CO₂) selama proses fermentasi heksosa. Senyawa CO₂ diperkirakan memiliki aktivitas menghambat bakteri melalui mekanisme yaitu terhambatnya dekarboksilasi enzimatis dan akumulasi CO₂ pada lipid yang mengakibatkan permeabilitas membran tidak bekerja (Ouweland dan Vesterlund, 2004).

Selain itu, bakteri asam laktat memproduksi *Anti Microbial Peptide* (AMP) atau dikenal dengan istilah bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Mallesha *et al.*, 2010).

Bakteriosin merupakan salah satu protein aktif atau kompleks protein yang memiliki aktivitas sebagai bakterisidal terhadap bakteri Gram positif. Bakteriosin juga bersifat *irreversible*, aktif pada konsentrasi rendah, mudah dicerna, berpengaruh positif terhadap kesehatan dan biasanya digunakan sebagai biopreservatif makanan. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dikarakterisasi sebagai peptida yang berasal dari ribosom. Bakteriosin berakumulasi di dalam media kultur selama fase pertumbuhan eksponensial hingga fase pertumbuhan stasioner (Vuyst dan Vandamme, 1994). Produksi tertinggi bakteriosin dengan aktivitas penghambatan terbesar yaitu pada pertengahan fase pertumbuhan eksponensial hingga awal fase stasioner dan aktivitasnya akan berkurang bahkan tidak terdeteksi lagi selama fase pertumbuhan stasioner. Produksi bakteriosin dipengaruhi oleh tipe dan level karbon, sumber nitrogen dan fosfat, surfaktan kation dan

mbat (Nowroozi *et al.*, 2004).



Bakteriosin bekerja dengan menarget sitoplasma dan memulai reaksi yang selanjutnya dapat mengubah permeabilitas dari membran sehingga hal ini dapat mengganggu transport membran atau menghilangkan tenaga gerak dari proton hal ini dapat menghambat pembentukan energi dan biosintesis protein dan asam nukleat (Nissen-Meyer at al. 1992).

Secara biologis bakteriosin disintesis sebagai prepeptida inaktif yang membawa sebuah N-termial yang terikat pada peptida utama untuk ditransilasikan menjadi C-terminal propeptida. Setelah terjadi proses transilasi, peptida utama yang membawa molekul propeptida di transportasikan dari dalam sitoplasma ke lingkungan luar melalui membran yang mempunyai ikatan pembawa ABC (*ATP-binding cassette*). Pembawa ABC akan bereaksi dengan enzim endopeptidase yang bertugas memotong peptida utama sehingga bagian propeptidanya dapat dikeluarkan ke lingkungan, sedangkan peptide utama tetap berada dalam sitoplasma untuk berperan kembali dalam sintesis bakteriosin selanjutnya. Senyawa propeptida kemudian menjadi peptide aktif oleh interaksi senyawa-senyawa lain yang juga dikeluarkan ke luar sel oleh BAL (Ray, 2004).

Secara umum bakteriosin dikelompokkan menjadi empat kelompok menurut Ouwehand dan Vesterlund (2004), sebagai berikut:

1. Kelas I (Lantibiotik)

Bakteriosin kelas I dinamakan lantibiotik, peptida kecil (<5 kDa).

ik mengandung lantionin dan tidak terdapat di alam (seperti lantionin



dan β -metil lantionin) dengan penambahan sejumlah asam amino terhidrasi. Contoh lantibiotik adalah nisin A, nisin Z, lacticin 481, lactocin S dan lain-lain

2. Kelas II

Bakteriosin kelas II memiliki ukuran kecil (<10 kDa), memiliki sifat stabil terhadap panas, tidak mengandung lantionin, dan merupakan peptida aktif membran. Kemudian dibagi menjadi tiga sub kelas yaitu: kelas IIa merupakan kelompok paling besar yang memiliki peptida *listeria-active* dengan sekumpulan sekuen amino-terminal, kelas IIb memiliki dua peptida dan kelas IIc merupakan bakteriosin teraktifasi-tiol

3. Kelas III

Bakteriosin ini memiliki ukuran besar (>30 kDa) dan tidak tahan terhadap panas. Bakteriosin kelas ini hanya diisolasi dari genus *Lactobacillus*. Bakteriosin dalam kelas ini tidak terlalu banyak dan masih sedikit pengetahuan tentang kelas bakteriosin ini.

4. Kelas IV

Bakteriosin kelas ini merupakan bakteriosin kompleks dengan karbohidrat atau lipid

Salah satu jenis bakteriosin yang paling banyak digunakan adalah nisin. Nisin dapat mencegah pembusukan keju olahan dan keju alami akibat *Clostridium*, memperpanjang masa simpan susu di negara yang bersuhu hangat, mencegah pertumbuhan *Lactobacilli* pembusuk pada fermentasi bir

e, dan memberi perlindungan tambahan terhadap spora *Clostridium cillus* pada produk olahan makanan kaleng. Nisin adalah bahan



tambahan pangan yang diijinkan oleh lebih dari 50 negara termasuk US dan Eropa dengan nama dagang Nisaplin. Kelemahan dari nisin yaitu hanya aktif pada pH rendah hingga netral dan tidak aktif pada pH tinggi (Vandenberg, 1993).

Untuk menentukan aktivitas bakteriosin dilakukan dengan meneteskan sepuluh mikro liter suspensi bakteriosin pada sumur agar dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 1 jam dan dilanjutkan inkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Kemudian diukur diameter zona hambat yang terbentuk disekitar sumur agar dengan menggunakan bantuan alat jangka sorong (*Vernier Caliper*). Aktivitas penghambatan oleh bakteriosin dinyatakan dengan *Arbitrary Units* per ml (AU/ml) (Simonova dan Laukova, 2007). Satu AU/ml dinyatakan sebagai luas daerah hambat per satuan volume sampel bakteriosin uji (mm²/mL) (Usmiati dan Marwati, 2007).

Peptida bioaktif merupakan fragmen protein yang terdiri dari susunan 2-20 asam amino yang terikat melalui ikatan peptida mempunyai dampak positif terhadap fungsional dan fungsi tubuh. Pada umumnya peptida bioaktif memiliki berat molekul yang rendah, memiliki lebih dari satu sifat fungsional dan berasal dari hewan dan tumbuhan. Peptida bioaktif dapat dibentuk dari makanan dengan cara pemutusan ikatan peptida dari protein utama menjadi ikatan peptida yang lebih pendek dengan susunan asam amino tertentu melalui hidrolisis enzim dan fermentasi mikroba (Korhonen, 2010).

Peptida bioaktif yang umum diproduksi BAL adalah *angiotensin I-converting enzyme [ACE]-inhibitory peptides*. Peptida ini berperan sebagai



protein spesifik yang memiliki efek antioksidatif pada fungsi atau kondisi tertentu yang bermanfaat dalam kesehatan. Terdapat peptida-peptida lain yang diproduksi selama fermentasi BAL, contohnya ekstrak larut air atau larutan garam (*water/salt-soluble extract*, WSE). Peptida-peptida dalam WSE diidentifikasi dengan menggunakan metode o-phthaldialdehyde (OPA) yang diekuivalensikan sebagai tripton. WSE terbukti memiliki potensi antioksidan terhadap auto oksidasi asam linoleat (Coda *et al*, 2012).

II.5 Faktor Mempengaruhi Produksi Peptida Aktif

Terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas produksi bakteriosin oleh bakteri asam laktat yaitu faktor pH, suhu, sumber nitrogen, serta fase pertumbuhan. Menurut Parente *et al.* (1997) dan Lejeune *et al.* (1998), produksi bakteriosin pada BAL berkaitan dengan pertumbuhannya, produksi bakteriosin biasanya terjadi sepanjang fase pertumbuhan dan berhenti pada akhir fase eksponensial (kadang-kadang sebelum akhir fase eksponensial). Sementara faktor suhu dapat meningkatkan dan menurunkan produksi bakteriosin, peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi bakteriosin (Jaya, 2004).

Selain faktor suhu dan fase pertumbuhan faktor pH memainkan peran penting dalam mempengaruhi produksi dari bakteriosin, variasi dalam pH sitoplasma menghambat aktivitas enzim, dan perubahan eksternal mungkin

menyebabkan ionisasi nutrisi molekul yang menghasilkan perubahan ketersediaan dan lebih sedikit pertumbuhan. Ekspresi gen



biosintetik untuk produksi bakteriosin juga dapat diatur oleh pH. (Motta As and Brendelli, 2007). Menurut Vandamme (1994), bakteriosin banyak dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan stabil pada pH asam dan pH netral dan tidak aktif pada pH diatas 8 (seperti nisin, lactosprepcin, pediocin Ach dan lain-lain). Berdasarkan percobaan Chatterjee *et al.* (2018) produksi maksimum bakteriosin pada pH 6,8 menunjukkan aktivitas 3.200 AU/ml, pada pH sedikit asam yaitu pH 4,5 produksi bakteriosin menurun menjadi 1.400 AU/m kemudian pada pH yang cukup basa yaitu pada pH 12,5 terjadi penurunan tajam dalam aktivitas bakteriosin yaitu 800 AU/ml.

II.6 Purifikasi dan Dialisis Senyawa Peptida Aktif

Proses purifikasi atau pemurnian dilakukan setelah proses ekstraksi protein, tujuannya yaitu untuk menghilangkan sisa zat pengotor dan zat lain yang tidak diinginkan sehingga tidak mengganggu kinerja dari protein yang diinginkan. Pemurnian biasanya dilakukan dengan metode presipitasi ionik dengan penambahan amonium sulfat. Proses ini berdasarkan prinsip salting in dan salting out yaitu mereduksi kelarutan protein dalam air. *Salting in* merupakan proses ionisasi oleh sejumlah garam amonium sehingga menyebabkan kelarutan protein dalam pelarutnya meningkat hal ini disebabkan karena molekul protein tertarik kearah pelarut. Sedangkan salting out adalah proses pengendapan protein akibat berkurangnya molekul pelarut yang dibutuhkan untuk melarutkan molekul protein akibat dari adanya konsentrasi garam (Scopes,1982). Tujuan lain dilakukan ini karena adanya kecenderungan molekul dari bakteriosin bergabung



dengan senyawa lainnya dan memiliki sifat hidrofobisitas (Jenie, 1996). Penambahan garam amonium pada kelarutan protein berbeda-beda, tergantung dari jumlah muatan ion yang terdapat dalam larutan. Semakin besar jumlah konsentrasi dan muatan ion dalam suatu larutan maka, semakin besar pula kekuatan dalam mengendapkan protein (Scopes, 1982).

Proses selanjutnya yaitu dialisis, tujuannya yaitu untuk menghilangkan pengotor non-protein yaitu garam ammonium sulfat yang sebelumnya telah digunakan pada proses purifikasi. Tujuan penghilangan garam amonium sulfat dikarenakan dapat menjadi inhibitor dari aktivitas protein yang diinginkan (Scopes, 1982). Prinsip dari dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul-molekul yang berukuran kecil dengan menggunakan bantuan membran semipermeabel. Pada proses ini digunakan kantong selofan yang memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein yang diinginkan tidak akan melewati pori-pori tersebut dan terperangkap dalam kantong selofan (Kristanti, 2001).

Pada proses dialisis garam amonium sulfat yang memiliki berat molekul lebih rendah dari molekul protein akan berpindah, berganti dengan larutan buffer dalam dialisat. Pada proses perpindahan garam melibatkan peristiwa tekanan osmotik untuk mempertahankan garam yang teradsorpsi pada permukaan membran dan bergerak dari sisi yang satu ke sisi yang lainnya.

Digunakan larutan buffer yang memiliki konsentrasi lebih kecil dari dari dalam kantong selofan sehingga molekul-molekul kecil dapat keluar melalui pori-pori membran (Kristanti, 2001).



II.7 Uji Aktivitas Antimikroba

Tujuan dari uji aktivitas antimikroba yaitu untuk menentukan potensi dan control kualitas senyawa antimikroba agar diperoleh sistem pengobatan efektif dan efisien. Pada uji aktivitas antimikroba dibedakan menjadi dua yaitu metode difusi dan metode dilusi. Menurut Pratiwi (2008), metode difusi dan dilusi terbagi atas beberapa metode sebagai berikut :

II.7.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan metode berdasarkan pengukuran zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dan dilakukan pengukuran zona bening setelah didiamkan selama 18-24 jam menggunakan jangka sorong.

II.7.1.1 Metode *disc diffusion* (test Kirby & Bauer)

Pada metode ini digunakan piringan yang telah berisi agen antimikroba diletakkan atau ditempelkan diatas media agar yang sebelumnya telah diinokulasikan mikroorganisme, kemudian agen anti mikroba akan berdifusi ke media agar. Terbentuknya zona bening di sekitar piringan pada permukaan media agar mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba.

II.7.1.2 *E-test*

Pada metode ini digunakan strip dari plastik yang berisi agen antimikroba dengan kadar yang berbeda-beda yaitu dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi kemudian diletakkan diatas permukaan agar yang sebelumnya telah diinokulasikan mikroorganisme. Dilakukan pada media yang jernih mengindikasikan kadar



tertentu dari agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

II.7.1.3 Ditch-plate technique

Pada metode ini dibuat parit pada media agar dalam cawan petri dengan cara dipotong secara membujur. Agen antimikroba diletakkan pada parit kemudian, digores dengan mikroba uji (maksimal 6) kearah parit yang berisi agen antimikroba.

II.7.1.4 Cup-plate technique

Pada metode ini sama dengan metode disc diffusion, akan tetapi pada metode ini dibuat lubang atau sumur pada agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme. Agen antimikroba dimasukkan kedalam lubang yang telah dibuat. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya zona hambatan pada sekitar lubang.

II.7.1.5 Gradient-plate technique

Pada metode ini dibuat konsentrasi yang bervariasi dari agen antimikroba pada media agar kemudian, media agar dicairkan dan larutan uji ditambahkan. Selanjutnya campuran dituang kedalam cawan petri lalu diletakkan pada posisi dimiringkan dan campuran kedua dituang diatas campuran sebelumnya. Kemudian plate diinkubasi selama 1 x 24 jam agar agen antimikroba berdifusi dan permukaan media mengering. Selanjutnya digores dengan mikroba uji (maksimal 6) dimulai dari konsentrasi tinggi ke



II.7.2 Metode Dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair dan dilusi padat sebagai berikut:

II.7.2.1 Metode dilusi cair/*broth dilution test (serial dilution)*

Metode ini digunakan untuk mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (kadar hambat minimum) dan MBC (*minimum bactericidal concentration*) atau KBM (kadar bunuh minimum). Pada metode ini dibuat seri pengenceran agen antimikroba dengan mikroba uji menggunakan medium. Hasil pengamatan dilihat berdasarkan seri pengenceran terkecil yang jernih menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroorganisme ditetapkan sebagai nilai MIC atau KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai nilai MIC atau KHM kemudian dikultur pada tanpa penambahan mikroorganisme dan agen antimikroba lalu diinkubasi 18-24 jam. Larutan yang tetap jernih setelah dilakukan inkubasi ditetapkan sebagai nilai KBM.

II.7.2.2 Metode padat/*solid dilution test*

Pada metode ini agen antimikroba diencerkan dalam media agar kemudian dituang dalam cawan petri, setelah campuran agar dan agen antimikroba memadat diinokulasikan dengan mikroorganisme dan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Nilai KHM ditetapkan pada konsentrasi terendah agen antimikroba yang masih mampu menghambat pertumbuhan

mikroorganisme. Keuntungan dari metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

