

**PENGARUH BAKTERIOSIN DARI  
*Streptococcus thermophilus* SEBAGAI PENGAWET  
TERHADAP LAMA PENYIMPANAN DANGKE**

**MAISARAH BASARANG  
N111 08 004**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2013**

**PENGARUH BAKTERIOSIN DARI *Streptococcus thermophilus*  
SEBAGAI PENGAWET TERHADAP LAMA PENYIMPANAN DANGKE**

**SKRIPSI**

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

**MAISARAH BASARANG  
N111 08 004**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2013**

**PENGARUH BAKTERIOSIN DARI *Streptococcus thermophilus*  
SEBAGAI PENGAWET TERHADAP LAMA PENYIMPANAN DANGKE**



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

**Pembimbing Pertama**

**Pembimbing Kedua**

**Dra.Hj.Sartini,M.Si.,Apt.**  
**NIP. 19611111 198703 2 001**

**Dra. Christiana Lethe, M.Si, Apt.**  
**NIP. 19481002 198203 2 001**

**Pada tanggal, Juli 2013**

**PENGESAHAN**  
**PENGARUH BAKTERIOSIN DARI *Streptococcus thermophilus***  
**SEBAGAI PENGAWET TERHADAP LAMA PENYIMPANAN DANGKE**

Oleh :  
**MAISARAH BASARANG**  
**N111 08 004**

**Dipertahankan Di Hadapan Panitia Penguji Skripsi**  
**Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin**  
**Pada tanggal : 25 Juli 2013**

Panitia Penguji Skripsi :

1. Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS, Apt. (Ketua) :.....
2. Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. (Sekertaris) :.....
3. Prof. Dr. H. Natsir Djide, MS., Apt. (Ex Officio) :.....
4. Dr. Hj. Sartini, M.Si., Apt. (Ex Officio) :.....
5. Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt. (Ex Officio) :.....
6. Abd. Rahim, S.Si., M.Si., Apt. (Anggota) :.....

Mengetahui :

**Dekan Fakultas Farmasi**  
**Universitas Hasanuddin**

**Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.**  
**NIP. 19560114 198601 2 001**

## **PERNYATAAN**

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 disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hal terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 21 Juli 2013

Penyusun

**MAISARAH BASARANG**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tiada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Mengetahui, Pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ayahanda Basarang Sialla (alm) yang semasa hidupnya terus memberikan dukungan, motivasi serta semangat, Ibunda Sahawi S.Pd, nenekku tercinta, kakak-kakakku Abdullah Mujahid Basarang dan Mujahidah Basarang serta adik-adikku Rasmus Sayyaf Basarang dan Muh.Imaduddin Basarang atas segala doa, kasih sayang, dorongan moril maupun material kepada penulis selama ini.

Dengan segala ketulusan hati penulis juga menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS, Apt. selaku pembimbing utama, Ibu Dr. Hj. Sartini, M.Si, Apt. selaku pembimbing pertama dan Ibu Dra.

Christiana Lethe, M.Si, Apt. selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu selama untuk memberi petunjuk, mengarahkan, membagi ilmu dan menyumbangkan ide-ide dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.

3. Bapak/ibu Wakil Dekan, Bapak dan Ibu staf pengajar Fakultas Farmasi UNHAS yang telah mendidik serta memberikan ilmu yang sangat berharga kepada penulis selama masa perkuliahan.
4. Ibu Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS, Apt., Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si, M.Si, Apt., dan Bapak Abdul Rahim, S.Si, M.Si, Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, masukan dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Kak Haslia S.Si selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin, Kak Anti S.Si selaku laboran Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, dan Kak Ismail S.Si, Apt. yang telah memberikan petunjuk, saran, bantuan, serta fasilitas laboratorium selama penulis melakukan penelitian.
6. Rekan-rekan mahasiswa Fakultas Farmasi khususnya Steroid 08 terkhusus lagi kepada Wahyudiana Tahir, Dian Ekawati, Stefani Mangisengi, Hasryani Rizka, Suryadi, Iffah Surayah Malik atas dukungan, bantuan, semangat serta motivasinya selama ini.
7. Kak Fahmid Mappa, S.Pt atas bantuan, dukungan serta motivasinya selama ini, serta seluruh pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu

persatu yang telah banyak memberikan bantuan, motivasi dan inspirasi bagi penulis selama masa perkuliahan sampai penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, banyak kekurangan dan kelemahan. Di dunia ini tak ada sesuatu apa pun yang sempurna karena kesempurnaan itu hanya milik-Nya. Maka dari itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan guna tambahan wawasan agar penelitian selanjutnya jauh lebih baik.

Akhirnya semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang farmasi, amin.

Makassar, 25 Juli 2013

Maisarah Basarang

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian pengaruh penambahan bakteriosin dari *Streptococcus thermophilus* sebagai pengawet terhadap lama penyimpanan dangke. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh Bakteriosin sebagai pengawet alami terhadap lama penyimpanan Dangke. Bakteriosin merupakan metabolit sekunder dari bakteri asam laktat yang diperoleh dari hasil fermentasi bakteri asam laktat spesies *Streptococcus thermophilus* pada media MRS Broth. Ekstrak kasar bakteriosin yang diperoleh dipekatkan 10 kali lalu diserbukkan dengan menggunakan maltodekstrin dengan perbandingan 1:1. Penelitian ini dilakukan dengan menambahkan pada dangke ekstrak kasar bakteriosin sebanyak 3 – 5% dan garam dapur 4% dari bobot dangke. Penyimpanan dilakukan pada suhu kamar dan suhu dingin, setelah itu dilakukan pemeriksaan pertumbuhan bakteri dengan metode ALT (Angka Lempeng Total) pada medium NA (Nutrient Agar) dan MRSA setiap 3 hari selama 9 hari. Hasil penelitian menunjukkan bakteriosin berpengaruh terhadap lama penyimpanan dangke, dimana penambahan bakteriosin pada dangke yang disimpan pada suhu kamar dapat meningkatkan daya simpan sampai 4 hari, sedangkan pada suhu dingin dapat meningkatkan daya simpan hingga 9 hari.

## ABSTRACT

Comparative research has been about bacteriosin additions from *Streptococcus thermophilus* as the preservatives for storage period of dangke. The aim of this research is to detect the influence of Bacteriosin as the natural preservatives for storage period of Dangke. Bacteriosin is a secondary metabolites of lactic acid bacteria derived from fermented lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus* in MRS Broth media. Crude extract of bacteriosin obtained then concentrated 10 times and powdered with maltodextrin with comparison ratio 1:1. The research was conducted by adding crude extract of bacteriosin about 3-5% and kitchen salt with 4% of the total weight of dangke then stored at room temperature and cold temperature. The next method is carried out the inspection of bacterial growth with ALT method (Total Numbers of Plate) on NA medium and MRSA every 3 days for 9 days. The results showed that bacteriosin has an effect of the storage period of dangke. The addition of bacteriosin in dangke which is stored at room temperature can enhance the storage period up to 4 days, whereas in cold temperatures the storage period can increase for up to 9 days.

## DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
II.1 Dangke.....	7
II.2 Masa Simpan Dangke.....	9
II.3 Pengawetan Makanan.....	11
II.4 Garam.....	14
II.5 BAL dan Bakteriosin.....	16
II.5.1 BAL.....	16
II.5.2 Morfologi <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	18
II.5.3 Bakteriosin.....	19
II.6 Analisis Kuantitatif Mikroorganisme.....	24
II.6.1 Perhitungan Massa Sel Secara Langsung dan Tidak Langsung	25

II.6.2 Perhitungan Jumlah Sel Metode Hitung Cawan.....	25
<b>BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....</b>	
III.1 Alat dan Bahan.....	30
III.2 Metode Kerja.....	30
III.2.1 Sterilisasi Alat.....	30
III.2.1 Pengambilan Sampel.....	30 31
III.3 Pembuatan Bakteri Starter.....	31
III.3.1 Pembuatan Media MRS Agar Miring.....	31
III.3.2 Peremajaan Bakteri Asam Laktat.....	32
III.3.3 Pembuatan Media Starter MRS Broth.....	32
III.3.4 Pembuatan Prekultur dan Kultur <i>Streptococcus thermophilus</i>	33
III.4 Produksi Bakteriosin.....	33
III.4.1 Pembuatan Crude Ekstrak (Bakteriosin Kasar).....	33
III.4.2 Pembuatan Bubuk Bakteriosin.....	34
III.5 Penetapan Kadar Bakteriosin Sebagai Protein dengan Metode Lowry.....	34
III.6 Penyiapan Sampel.....	35
III.7 Analisis Kandungan Mikroba.....	35
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	36
IV.1 Data Hasil Penelitian.....	36
IV.1.1 Produksi Bakteriosin.....	36
IV.1.2 Hasil Pengamatan dan Pengujian.....	36

IV.2 Pembahasan.....	38
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
V.1 Kesimpulan .....	46
V.2 Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	52

## DAFTAR TABEL

### Tabel

1. Table Data perubahan secara organoleptis.....	35
2. Tabel pelaporan data penghitungan jumlah koloni suhu kamar....	36
3. Tabel pelaporan data penghitungan jumlah koloni suhu kamar....	36
4. Table Data Uji Organoleptik Dangke Tanpa Perlakuan (Negatif) Pada Suhu Kamar.....	53
5. Table Data Uji Organoleptik Garam Pada Suhu Kamar.....	53
6. Table Data Uji Organoleptik Bakteriosin Pada Suhu Kamar.....	53
7. Table Data Uji Organoleptik Dangke Tanpa Perlakuan (Negatif) Pada Suhu Dingin.....	54
8. Tabel Data Uji Organoleptik Garam Pada Suhu Dingin.....	54
9. Tabel Data Uji Organoleptik Bakteriosin Pada Suhu Dingin.....	54
10. Tabel Data Hasil Penghitungan Jumlah Koloni Suhu kamar.....	55
11. Tabel Data Kasar Hasil Penghitungan Jumlah Koloni Suhu Kamar	55
12. Tabel Data Hasil Penghitungan Jumlah Koloni Suhu Dingin.....	56
13. Tabel Data Kasar Hasil Penghitungan Jumlah Koloni Suhu Dingin	56
14. Tabel Data pengukuran Kadar Protein Bakteriosin.....	64

## DAFTAR GAMBAR

### GAMBAR

1. Mekanisme aksi Bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen	24
2. Bakteriosin.....	67
3. Uji Daya Hambat Bakteriosin .....	67
4. Dangke Utuh.....	68
5. Dangke yang telah dipotong kecil-kecil siap untuk diberi perlakuan	68
6. BAL Dangke.....	69
7. Dangke yang telah diberikan perlakuan pengawet.....	69

## DAFTAR LAMPIRAN

### LAMPIRAN

1. Skema Kerja Perbandingan Beberapa Pengawet Terhadap Lama Penyimpanan Dangke.....	52
2. Skema ekstraksi Bakteriosin dari Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) spesies <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	53
3. Skema Analisis Kandungan mikroorganisme sampel.....	54
4. Data Hasil Pengamatan Secara Organoleptis.....	55
5. Data Hasil Pengujian Pertumbuhan Mikroba.....	57
6. Perhitungan untuk Pelaporan Pertumbuhan Koloni.....	59
7. Data Pengukuran Kadar Protein Bakteriosin Metode Lowry.....	66
8. Dokumentasi Penelitian.....	68
9. Komposisi Dan Cara Pembuatan Media.....	71

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

Susu adalah cairan berwarna putih yang diperoleh dari pemerahan sapi atau hewan menyusui lainnya, yang dapat dimakan atau digunakan sebagai bahan pangan yang sehat, tidak mengalami penambahan atau pengurangan komponen apapun. Susu merupakan bahan makanan yang bergizi tinggi, tersusun dengan proporsi yang seimbang dan sempurna, mudah dicerna dan sangat baik untuk pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh. Susu telah dipergunakan manusia untuk bahan pangan baik dalam bentuk aslinya ataupun sudah diolah menjadi bentuk lainnya (1,3,4).

Seiring dengan perkembangan zaman dan kemajuan teknologi pengolahan susu pun telah banyak menghasilkan produk-produk dengan pengolahan yang modern. Namun masih banyak pula pengolahan susu yang dilakukan dengan cara tradisional. Dibeberapa daerah tertentu di Indonesia mempunyai hasil pengolahan susu tradisional dari susu sapi atau kerbau, seperti “Dangke” dari Sulawesi Selatan, “Bagot ni horbo” dari Tapanuli dan “Litsusu” dari Nusa Tenggara (5).

Salah satu bahan makanan hasil olahan susu yang cukup terkenal di Sulawesi Selatan yang pengolahannya masih secara tradisional adalah “Dangke” yang berasal dari Kabupaten Enrekang. Dangke adalah sejenis makanan bergizi dan khas yang dibuat dari susu kerbau atau susu sapi. Seperti yang diketahui bahwa “Dangke” dibuat dengan cara tradisional yaitu memanaskan susu sapi atau kerbau yang segar sampai mendidih

lalu ditambahkan getah pepaya muda yang mengandung enzim papain untuk menggumpalkan susu (2).

Selain menggunakan getah pepaya saat ini telah berkembang penelitian-penelitian untuk menggunakan bahan lain sebagai koagulan dalam pembuatan dangke yang diharapkan tidak hanya bermanfaat untuk pembentukan *curd* pada pembuatan dangke tetapi juga dapat meningkatkan nilai gizi yang terkandung dalam dangke, salah satunya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan Hasryani Rizkha pada pembuatan dangke dengan membandingkan penggunaan getah pepaya, bakteri asam laktat dan gabungan getah pepaya dan bakteri asam laktat terhadap kadar protein yang terkandung dalam dangke serta bagaimana pengaruhnya terhadap massa dan tekstur dangke yang dihasilkan. Setelah dilakukan pengamatan diperoleh bahwa dangke yang dibuat dengan menggunakan BAL menghasilkan kadar protein paling tinggi. Selain itu dangke yang dibuat dengan BAL ini menghasilkan tekstur yang lebih lembut dibandingkan dengan pembuatan dangke secara tradisional yakni menggunakan getah pepaya. Dangke memiliki aroma yang khas, tetapi dengan menggunakan BAL aroma khas yang timbul lebih terasa segar dibandingkan dengan dangke yang dibuat dengan menggunakan getah pepaya (14).

Salah satu kendala yang dialami dalam pengembangan makanan khas tradisional ini adalah ketidak-seragaman kualitas produk yang

dihasilkan oleh masyarakat dan masa simpan produk yang masih cukup singkat sehingga relatif sulit dalam menjangkau wilayah pemasaran yang lebih luas. Dangka yang disimpan pada suhu dingin (5-10°C) mempunyai umur simpan 21 hari, sedangkan pada suhu kamar (30°) hanya 2 hari saja (2). Alternatif dalam mengatasi masalah tersebut salah satunya dengan pengawetan makanan.

Metode pengawetan yang telah banyak diaplikasikan adalah penambahan bahan pengawet pada makanan, baik bahan pengawet sintesis maupun alami. Penggunaan pengawet sintesis dapat menyebabkan kemungkinan toksin akibat residu yang masih aktif, bahaya mikroorganisme yang resisten dan dapat menimbulkan infeksi pada konsumen. Penggunaan bahan pengawet alami seperti garam dan kunyit lebih berpotensi untuk diaplikasikan sebagai pengganti pengawet sintesis.

BAL dapat berfungsi sebagai pengawet makanan karena dapat memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungannya dan mengekskresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diasetil, CO<sub>2</sub>, asetaldehid, d-isomer asam-asam amino dan bakteriosin (15).

Bakteri Asam Laktat (BAL) termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, maka disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognize As Safe (GRAS)* yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan,

bahkan beberapa jenis bakteri tersebut berguna bagi kesehatan. BAL bermanfaat untuk peningkatan kualitas *higiene* dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat pathogen (15).

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang diekskresikan oleh bakteri asam laktat yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama yang memiliki kekerabatan erat secara filogenik. Bakteriosin berpotensi digunakan sebagai bahan pengawet pangan alami yang aman untuk dikonsumsi, karena zat aktif yang terdapat dalam bakteriosin adalah protein yang dapat didegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia (15).

Bakteriosin telah banyak digunakan sebagai pengawet alami untuk makanan, baik secara langsung maupun tidak langsung yakni dengan menambahkan biakan BAL pada makanan atau menggunakan bakteriosin secara langsung pada makanan. Bakteriosin merupakan suatu senyawa protein yang memiliki sifat bakterisidal terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Pada awalnya bakteriosin diketahui hanya menghambat pertumbuhan bakteri yang berkerabat dekat dengan sel produser (filogenik), tetapi pada saat ini beberapa jenis bakteriosin menunjukkan spektrum yang lebih luas. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat sangat menguntungkan bagi industri pangan karena aktivitasnya mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembawa penyakit yang biasanya terdapat pada makanan (42).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat telah menarik banyak perhatian pada beberapa tahun terakhir ini karena senyawa tersebut potensial digunakan sebagai pengawet makanan. Substansi ini merupakan protein sehingga dapat terdegradasi pada pencernaan manusia dan hewan. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat ada yang telah digunakan sebagai pengawet makanan terutama dalam keju dan susu dan berbagai produk makanan lainnya (45). Bakteriosin asal bakteri asam laktat mudah diterima sebagai bahan tambahan oleh para ahli kesehatan dan lebih penting oleh konsumen karena bakteri asam laktat biasanya secara alami memang berada dalam proses fermentasi makanan (42). Bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan bakteri psikrofilik yang terdapat pada susu pasteurisasi, susu skim steril yang diinokulasikan dengan psikrofilik yang disimpan pada suhu dingin hingga 16 hari dan setengahnya untuk suhu kamar (23).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat mengalami degradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan tidak membahayakan bagi kesehatan manusia. Selain itu, bakteriosin juga memiliki kestabilan terhadap pengaruh pH dan suhu. Bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas yang stabil pada kondisi asam maupun basa, sehingga sangat potensial dimanfaatkan oleh industri yang dalam prosesnya melibatkan kondisi asam maupun basa. Pengaruh suhu, bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas yang stabil setelah diberikan perlakuan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai  $100^{\circ}\text{C}$  sehingga sangat baik jika

digunakan pada industri yang melibatkan kondisi panas maupun dingin pada proses produksinya sehingga dapat digunakan dalam proses di industri pangan yang biasanya melibatkan pengaturan suhu dan pH (43).

Berdasarkan uraian di atas, maka masalah yang timbul adalah bagaimana pengaplikasian bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat sebagai pengawet dan bagaimana pengaruhnya terhadap lama penyimpanan dangke.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan bakteriosin yang dihasilkan dari BAL sebagai pengawet terhadap lama penyimpanan dangke.

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan pengetahuan tentang pengaruh Bakteriosin sebagai pengawet alami terhadap lama penyimpanan Dangke, sehingga dapat dipertimbangkan untuk menjadi alternatif dalam pengembangan makanan khas tradisional dari Kabupaten Enrekang ini.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Dangke

Dangke merupakan produk olahan susu kerbau secara tradisional yang berasal dari Sulawesi Selatan. Daerah yang terkenal sebagai penghasil dangke di Sulawesi Selatan adalah kabupaten Enrekang, yaitu kecamatan Baraka, Anggeraja dan Alla' (2).

Dangke telah dikenal sejak tahun 1905. Nama dangke diduga berasal dari bahasa Belanda, yaitu *dangk U* yang berarti terima kasih, yang diucapkan oleh orang Belanda ketika mengkonsumsi produk olahan susu yang berasal dari susu kerbau ini. Dari kata *dangk U* inilah asal nama dangke untuk produk susu olahan rakyat kabupaten Enrekang ini (2).

Dangke dibuat dari susu sapi atau susu kerbau yang diperah dan belum pecah, lalu dipanaskan dengan api kecil sampai mendidih kemudian ditambahkan getah papaya. Penambahan ini dilakukan sedikit demi sedikit sampai terjadi gumpalan-gumpalan dan susu tidak meluap lagi. Untuk 1 liter susu ditambahkan dengan 1 sendok teh getah papaya (enzim papain). Penambahan yang berlebihan dapat menyebabkan Dangke terasa pahit. Setelah penambahan tersebut, susu diaduk perlahan-lahan selama lebih kurang 15 menit. Bila "curd" telah terbentuk dan dapat dipisahkan dari "whey", "curd" tersebut ditempatkan dalam tempurung kelapa untuk kemudian ditekan dan dicetak. Dangke yang

telah jadi dibungkus daun pisang dan ada kalanya untuk bisa tahan lama ditaburi garam dapur (16).

Dalam pembuatan dangke umumnya menggunakan getah pepaya, tetapi dapat juga menggunakan sari nenas sebagai sumber enzim bromelin. Selain itu telah diteliti pula bahwa penggunaan bakteri asam laktat (BAL) juga dapat digunakan sebagai koagulan pada pembuatan dangke. Warna dangke dengan menggunakan getah pepaya diperoleh warna khas susu yaitu putih, pada penggunaan sari nenas warna dangke agak kekuningan, sedangkan dengan menggunakan BAL warna dangke sama dengan menggunakan getah pepaya (14,17).

Dangke yang dibuat dengan menggunakan BAL menghasilkan kadar protein cukup tinggi mencapai 20,33%. Selain itu dangke yang dibuat dengan BAL ini menghasilkan tekstur yang lebih lembut dibandingkan dengan pembuatan dangke secara tradisional yakni menggunakan getah pepaya. Dangke memiliki aroma yang khas, tetapi dengan menggunakan BAL aroma khas yang timbul lebih terasa segar dibandingkan dengan dangke yang dibuat dengan menggunakan getah pepaya (14).

Dangke mengandung air sekitar 47,75%, lemak 33,89%, protein 17,01 serta komponen lainnya dalam jumlah kecil yaitu vitamin dan mineral (2).

## II.2 Masa Simpan Dangke

Masa simpan atau umur simpan bahan pangan adalah waktu tenggang atau selang suatu bahan pangan dapat disimpan dalam keadaan masih dapat di konsumsi. Masa simpan erat kaitannya dengan proses pembusukan dan kerusakan bahan pangan (18).

Pemasaran dangke ini tidak hanya di daerah Sulawesi Selatan, tetapi bahkan sampai ke Kalimantan, Jakarta, Papua, Malaysia, dan daerah-daerah dimana komunitas masyarakat Enrekang berada. Dangke banyak terdapat di Sulawesi Selatan umumnya dikonsumsi sebagai lauk pauk. Dangke asli berwarna putih dan bersifat elastis sedangkan dangke campuran (palsu) warnanya agak kuning kusam dan tidak elastis (2).

Salah satu kendala yang dialami dalam pengembangan makanan khas tradisional ini adalah ketidak-seragaman kualitas produk yang dihasilkan oleh masyarakat dan masa simpan produk yang masih cukup singkat sehingga relatif sulit dalam menjangkau wilayah pemasaran yang lebih luas. Hal ini disebabkan karena dangke mengandung air yang tinggi sehingga merupakan media yang baik bagi pertumbuhan mikroba pembusuk.

Pada dasarnya proses pembuatan “dangke” sama dengan pembuatan keju (*cheese*) dan beberapa produk tradisional yang ada di daerah lain seperti “*dadih*” di Sumatera Barat, “*dali*” di Sumatra Utara dan “*Colo Ganti*” atau “*Susu Kaya*” atau “*Segan Jadi*” atau *Pesjadi* (Bima) atau *Perah* (Lombok Timur) (2). Produk olahan susu tersebut dihasilkan dari

penggumpalan protein susu (kasein) dengan enzim proteolitik yang digabungkan dengan proses pemanasan atau pengasaman oleh bakteri asam laktat (2).

Adapun tujuan pengolahan susu menjadi Dangke agar dapat disimpan lebih lama dan mencegah terjadinya kerusakan pada air susu. Selain itu untuk mempertahankan kualitas Dangke biasanya Dangke direndam di dalam larutan garam jenuh selama satu jam dan dikeringkan pada suhu kamar selama 160 menit serta dibungkus dengan plastic. Dengan cara ini Dangke dapat bertahan untuk jangka waktu dua bulan. Dangke merupakan bahan pangan dengan nilai gizi yang tinggi (2).

Dangke yang disimpan pada suhu dingin ( $5^{\circ}\text{C}$ - $10^{\circ}\text{C}$ ) dengan penambahan asam sorbat dengan konsentrasi 0,15%, masih layak dikonsumsi sampai penyimpanan pada bulan ke-6, sedangkan untuk produk dangke tanpa penambahan asam sorbat mempunyai umur simpan hanya 21 hari. Dangke yang disimpan pada suhu kamar ( $30^{\circ}\text{C}$ ) dengan penambahan asam sorbat dengan konsentrasi 0,15% mempunyai daya simpan sampai 5 hari, sedangkan untuk produk dangke tanpa penambahan asam sorbat, daya simpannya hanya 2 hari saja (2).

Masa simpan erat kaitannya dengan perubahan yang terjadi pada produk pangan, baik perubahan fisik, biologis maupun kimiawi. Semua perubahan tersebut merupakan rangkaian proses yang akan menyebabkan bahan pangan membusuk, sehingga tidak layak lagi untuk dikonsumsi. Proses pembusukan dan perusakan ini dapat dihambat

secara fisik yaitu dengan pengeringan dan pendinginan, secara kimiawi yaitu dengan penambahan larutan garam, larutan asam, dan secara biologis yaitu menggunakan mikroba antagonis untuk menghambat aktivitas bakteri pembusuk (18).

### **II.3 Pengawetan Makanan**

Bahan pangan merupakan kebutuhan pokok bagi manusia di samping pendidikan, kesehatan dan sandang lainnya. Kebutuhan bahan pangan ini akan terus meningkat sesuai dengan laju pertumbuhan penduduk. Bahan pangan tersebut akan mengalami perubahan-perubahan yang tidak diinginkan antara lain pembusukan dan ketengikan. Proses pembusukan dan ketengikan disebabkan oleh adanya reaksi kimia yang bersumber dari dalam dan dari luar bahan pangan tersebut (19).

Faktor dari luar bisa berupa aktivitas mikroorganisme, sedangkan faktor dari dalam bisa berupa proses oksidasi. Sebagai contoh susu menjadi basi, roti berjamur, pembusukan pada daging, sayur melunak serta ketengikan pada makanan yang mengandung lemak dan minyak. Contoh tersebut merupakan bentuk-bentuk kerusakan makanan yang disebabkan mikroorganisme patogen, yang dapat dikenali dengan : (8)

#### **1. Berjamur**

Terdapat di bagian luar permukaan makanan yang tercemar akibat adanya kapang anaerob. Makanan menjadi lekat, berbulu dan berwarna sebagai hasil produksi miselium dan spora kapang.

## 2. Pembusukan (*rots*)

Rusaknya bahan pangan menjadi lunak dan berair yang disebabkan oleh rusaknya struktur jaringan bahan pangan tersebut.

## 3. Berlendir

Tumbuhnya lendir pada permukaan makanan, umumnya disebabkan oleh pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan makanan yang basah sehingga terjadi perubahan flavor, bau yang menyimpang, atau pembentukan lendir dari makanan tersebut.

## 4. Perubahan warna

Terjadinya perubahan pigmen dari bahan pangan akibat terbentuknya koloni mikroorganisme.

## 5. Berlendir kental seperti tali (*ropiness*)

Perubahan pada makanan yang disebabkan terbentuknya kista pada permukaan makanan tersebut.

## 6. Kerusakan fermentatif

Kerusakan ini bisa ditandai dengan perubahan flavor dan pembentukan gas pada makanan hasil fermentasi.

## 7. Pembusukan bahan-bahan berprotein (*putrefraction*)

Dekomposisi anaerobik protein menjadi peptida atau asam amino mengakibatkan bau busuk pada makanan, akibat terbentuknya amonia, hidrogen sulfida, amin dan senyawa bau lainnya.

Kerusakan tersebut dapat dikurangi dengan penambahan bahan pengawet baik alami maupun sintesis seperti formalin, asam benzoat,

BHA (*Butylated Hydroxyanisol*), BHT (*Butylated Hidroxytoluene*) dan TBHQ (*Tertier Butylated Hydroxyanisole*) terutama untuk bahan makanan semi basah (8, 19).

Pada saat ini penggunaan bahan pengawet dan antioksidan sintesis tidak direkomendasikan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) karena diduga dapat menimbulkan penyakit kanker (*carcinogen agent*). Karena itu perlu dicari alternatif lain yaitu bahan pengawet dan antioksidan alami (19). Teknik pengawetan alami dilakukan dengan pengaturan suhu, kadar air dan aliran udara (8).

Pada prinsipnya pengolahan lebih lanjut atau pengawetan makanan (*food preservatives*) dibedakan atas lama penyimpanan makanan tersebut sebelum digunakan. Pada makanan segera diolah atau dikonsumsi, sebaiknya bahan makanan dibiarkan dalam keadaan segar. Untuk penggunaan lebih lama, diperlukan upaya untuk mengurangi kerusakan akibat mikroorganisme, berupa : (8)

1. Penggunaan panas atau radiasi ion dan pengemasan untuk mengurangi kerusakan mikroorganisme. Proses yang digunakan adalah pengolahan termal dengan penggunaan panas atau suhu tinggi.
2. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme dalam bahan pangan berkadar air normal dengan pendinginan, pengasapan, perendaman dalam larutan garam (*curing*), penambahan bahan pengawet kimia, pengasapan dan penyimpanan dengan gas.

3. Pengurangan jumlah mikroorganisme dengan mengurangi kadar air, dengan cara pengeringan, penambahan gula, garam, pengental dan lain sebagainya.
4. Penghilangan mikroorganisme melalui penyaringan secara steril melalui pasteurisasi dan sterilisasi.

Umumnya metode pengawetan makanan merupakan kombinasi dari dua atau lebih dasar-dasar pokok yang disebut di atas.

#### **II.4 Garam**

Garam digunakan sebagai salah satu metode pengawetan pangan yang pertama dan masih digunakan secara luas untuk mengawetkan berbagai macam makanan. Garam yang merupakan zat pengawet organik adalah bahan yang sangat penting dalam pengawetan ikan, daging, dan bahan pangan lainnya di Indonesia. Sejumlah kecil garam biasanya ditambahkan secara langsung atau melalui perendaman terhadap beberapa macam makanan untuk memperbaiki rasa, flavor dan menjaga mutu selama penyimpanan.

Garam yang digunakan adalah garam dapur yang sering disebut juga "*common salt*". Secara teoritis garam yang berasal dari penguapan air laut mempunyai kadar natrium klorida di atas 97% akan tetapi dalam prakteknya kadar natrium klorida di bawah 97% (31). Sifat antimikroorganisme garam akan menghambat secara selektif. Air ditarik dari dalam sel mikroba sehingga sel menjadi kering, yang disebut proses osmosis. Mikroorganisme pembusuk atau proteolitik dan juga pembentuk

spora adalah yang paling terpengaruh walau dengan kadar garam yang rendah sekalipun (sampai 6%) (32).

Garam juga mempengaruhi aktivitas air ( $a_w$ ) dari bahan sehingga mengendalikan pertumbuhan mikroorganisme dengan suatu metode yang bebas dari pengaruh racunnya (32). Penggunaan garam juga tergantung dari jenis bahan pangan yang diawetkan walaupun dengan semakin tingginya konsentrasi garam yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Pada konsentrasi NaCl sebesar 2-5% yang dikombinasikan dengan suhu rendah, cukup untuk mencegah pertumbuhan mikroba psikrofilik (32). Selain itu, penggunaan garam sebagai bahan pengawet akan mempengaruhi penerimaan rasa dari jenis pangan, terutama tahu yang mempunyai rasa tawar dan rasa yang khas.

Mekanisme pengawetan NaCl adalah dengan memecahkan (plasmolisis) membran sel mikroba, karena NaCl mempunyai tekanan osmotik yang tinggi. Disamping itu, NaCl bersifat higroskopis sehingga dapat menyerap air dari bahan yang mengakibatkan  $a_w$  dari bahan tersebut menjadi rendah. Selain itu NaCl dapat mengurangi kelarutan oksigen, sehingga mikroba aerob dapat dicegah pertumbuhannya (32).

## II.5 BAL dan Bakteriosin

### II.5.1 BAL

Fermentasi adalah teknologi pengolahan dan pengawetan yang dilakukan dengan cara meningkatkan jumlah mikroba yang diinginkan dan mengeliminasi jumlah mikroba yang tidak diinginkan. Bakteri asam laktat mempunyai peranan esensial hampir dalam semua proses fermentasi makanan dan minuman. Peran utama bakteri ini dalam industry makanan adalah untuk pengasam bahan mentah dengan memproduksi sebagian besar asam laktat (bakteri homofermentatif) atau asam laktat, asam asetat, etanol dan CO<sub>2</sub> (bakteri heterofermentatif) (18). Asam-asam organik dari produk fermentasi merupakan hasil hidrolisis asam lemak dan juga sebagai hasil aktivitas pertumbuhan bakteri. Penentuan kuantitatif asam organik pada produk fermentasi sangat penting untuk kontribusi aroma sebagian besar produk fermentasi, untuk gizi, dan sebagai indicator aktivitas bakteri (33). Asam-asam organik juga sering digunakan sebagai acidulants (bahan pengasam) yang dapat menurunkan pH sehingga pertumbuhan mikroba berbahaya pada produk fermentasi akan terhambat.

BAL terdiri atas beberapa genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Tetracoccus*, *Weisella*, *Streptococcus*, *Oenococcus* dan *Bifidobacterium* (33, 35). Kelompok bakteri ini termasuk bakteri Gram positif, tidak berspora, tidak berpigmen mesofil, serta berbentuk kokus dan

batang. Bakteri ini dapat hidup pada temperatur antara 5 – 50 °C dan bersifat katalase negatif (35).

Berdasarkan sifat memfermentasinya, BAL dibedakan mejadi 2 kelompok yaitu BAL homofermentatif yang hanya menghasilkan asam laktat, dan BAL heterofermentatif yang menghasilkan asam laktat, etanol atau asam asetat, dan CO<sub>2</sub>. Sifat yang terpenting dari BAL adalah kemampuannya memfermentasi gula menjadi asam laktat. Produksi asam inilah yang pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dan membantu meningkatkan absorpsi mineral (kalsium). Produksi asam laktat oleh BAL berlangsung secara cepat sehingga menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan (33).

Mikroba yang biasa digunakan sebagai starter dalam fermentasi susu adalah bakteri asam laktat. Bakteri starter memiliki peranan yang terpenting dalam pembuatan keju, diantaranya :

- Mengembangkan asam dalam dangke (menurunkn pH)
- Menekan bakteri yang tahan pasteurisasi atau rekontaminasi bakteri yang membutuhkan laktosa atau tidak bisa mentolerir asam laktat
- Membantu kerja proteolitik dari papain
- Membantu penggabungan partikel-partikel curd

Bakteri starter yang paling sering digunakan adalah starter campuran (mixed-strain), dimana dua atau lebih turunan bakteri

mesophilic dan thermophilic berada dalam simbiosis mutualisme yang saling menguntungkan. Biakan ini tidak hanya memproduksi asam laktat tetapi juga komponen aroma dan CO<sub>2</sub>. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat (18).

Selain itu bakteri asam laktat sebagai starter berperan pula pada pembentukan dangke. Pembuatan dangke atau proses penggumpalan pada dangke mulai terjadi pada saat penambahan kultur starter. Kultur starter tersebut akan mengubah laktosa menjadi asam laktat menyebabkan pH menurun sehingga dapat membantu dalam proses koagulasi (34).

### **II.5.2 Morfologi *Streptococcus thermophilus***

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria  
Divisi : Firmicutes  
Kelas : Bacilli  
Order : Lactobacillales  
Family : Streptococcaceae  
Genus : Streptococcus  
Spesies : S.salivarius  
Subspesies : S. salivarius subsp. thermophilus

*Streptococcus thermophilus* adalah bakteri anaerob fakultatif gram positif. Bakteri ini tidak membentuk spora dan homofermentatif. *Streptococcus thermophilus* ditemukan di susu dan produk susu. Bakteri ini bukanlah probiotik karena tidak bertahan hidup di perut (37).

*S. thermophilus* memiliki bentuk sel yang bulat atau elips dengan diameter 0,7-0,9  $\mu\text{m}$ , tumbuh secara berpasangan atau berbentuk rantai pendek. Suhu pertumbuhan optimum untuk *S. thermophilus* adalah 37-42°C (36).

*S. thermophilus* merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, tidak berspora, uniseluler, anaerob, heterotropik, tumbuh baik pada media berisi karbohidrat dan ekstrak yeast. Tumbuh optimum pada pH 6,5 dan akan terhenti pertumbuhannya pada pH 4,2-4,4 (36).

*S. thermophilus* memfermentasi gula terutama menjadi asam laktat, dan karena itu ia termasuk golongan bakteri asam laktat. Ia merupakan salah satu dari dua bakteri yang dibutuhkan untuk memproduksi yogurt dan susu fermentasi lainnya, dan memiliki peran penting terutama dalam pembentukan tekstur dan citarasa yogurt (36).

### **II.5.3 Bakteriosin**

Bakteriosin merupakan senyawa peptida antimikroba yang berasal dari bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteriosin dapat bersifat kationik, anionik dan netral. Senyawa ini disintesis dalam ribosom bakteri serta memiliki aktivitas bervariasi dalam spektrum antimikroba yang luas (38). Bakteriosin merupakan peptida ekstraselular bioaktif atau peptida

kompleks yang bakterisida atau bakterostatik melawan spesies lain, terutama bakteri dengan strain yang berdekatan. Akan tetapi, dalam beberapa kasus, bakteriosin juga dapat melawan bakteri dengan strain yang berjauhan dengan bakteri penghasilnya (39).

Beberapa galur bakteri asam laktat (BAL) dapat menghasilkan senyawa protein yang disebut bakteriosin, dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Pemakaian bakteriosin komersial sebagai biopreservatif sudah dilakukan di beberapa negara dan diaplikasikan pada beberapa jenis makanan (20).

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang paling banyak menghasilkan bakteriosin. Secara umum, bakteriosin yang disekresikan oleh BAL merupakan peptida kationik kecil dengan 30 sampai 60 residu asam amino dan tahan terhadap pemanasan (41). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, ditemukan sebanyak lebih dari 50 jenis bakteriosin berbeda yang dihasilkan oleh BAL. Beberapa bakteriosin dari BAL yang telah dikarakterisasi adalah Nisin yang dihasilkan dari beberapa strain *Lactococcus lactis*, Lactococcus A dan B dari *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, Pediocin dari *Pediococcus acidilactici*, Lactacin dari *Lactobacillus jhonsonii*, Lactostrepsin dari *Streptococcus cremoris*, dan Curvacin dari *Lactobacillus curvatus* (40).

Bakteriosin dapat diproduksi oleh *Lactococcus*, *Lactobacillus* dan *Pediococcus* yang berasal dari berbagai bahan makanan, misalnya nisin diproduksi oleh *Lactococcus lactis*, pediosin AcH dihasilkan *Pediococcus*

*acidilactic*. Beberapa kelebihan bakteriosin sehingga potensial digunakan sebagai biopreservatif yaitu: (21).

1. Bukan bahan toksik dan mudah mengalami degradasi oleh enzim proteolitik karena merupakan senyawa protein;
2. Tidak membahayakan mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan;
3. Dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai pengawet pangan;
4. Penggunaannya fleksibel;
5. Stabil terhadap pH dan suhu yang cukup luas sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin.

Menurut Klaenhammer (1988) bakteriosin yang dihasilkan oleh beberapa galur BAL telah diketahui mempunyai aktivitas hambat terhadap bakteri pembusuk dan patogen makanan yang dapat meningkatkan keamanan dan daya simpan pangan. Klaenhammer (1988) mengelompokkan bakteriosin menjadi empat, yaitu :

1. Lantibiotik, merupakan bakteriosin yang mengandung cincin lantionin dalam molekulnya, contohnya nisin, Lacticin 481, Lactacin S, Streptococcin SA-FF22.
2. Bakteriosin kecil (< 10 kDa), relatif tahan panas, peptide pada sisi aktifnya tidak mengandung lantionin. Kelompok kedua ini dibagi lagi dalam tiga sub kelas. Kelas IIa mempunyai peptide listria-active

dengan sekumpulan sekuen N-terminal. Kelas IIb adalah kelompok bakteriosin yang biasanya membentuk kompleks berpori dengan aktifitas dua peptida yang berbeda. Kelas IIc adalah bakteriosin yang memerlukan peptide teraktifasi-tiol untuk mengurangi residu sistein dalam aktivitasnya.

3. Bakteriosin bermolekul protein besar (>30 kDa) dengan protein tidak tahan panas, contoh Helvetion J dan Brevicin 27.
4. Bakteriosin yang mengandung protein kompleks, terdiri atas komponen karbohidrat maupun lipid, contoh plantarisin S yang mengandung glikoprotein (45).

Bakteriosin sebagai agen biopreservatif sangat potensial digunakan untuk mengendalikan beberapa bakteri kontaminan, tetapi secara komersial ketersediaanya masih sedikit dan harganya sangat mahal. Di lain pihak, koleksi BAL di Indonesia dapat dimanfaatkan untuk produksi bakteriosin karena tersedia cukup banyak. Produksi bakteriosin umumnya dilakukan dalam substrat cair. Secara umum kondisi optimum produksi bakteriosin dipengaruhi oleh fase pertumbuhan, pH media, suhu inkubasi, jenis sumber karbon, jenis sumber nitrogen, dan konsentrasi NaCl (20).

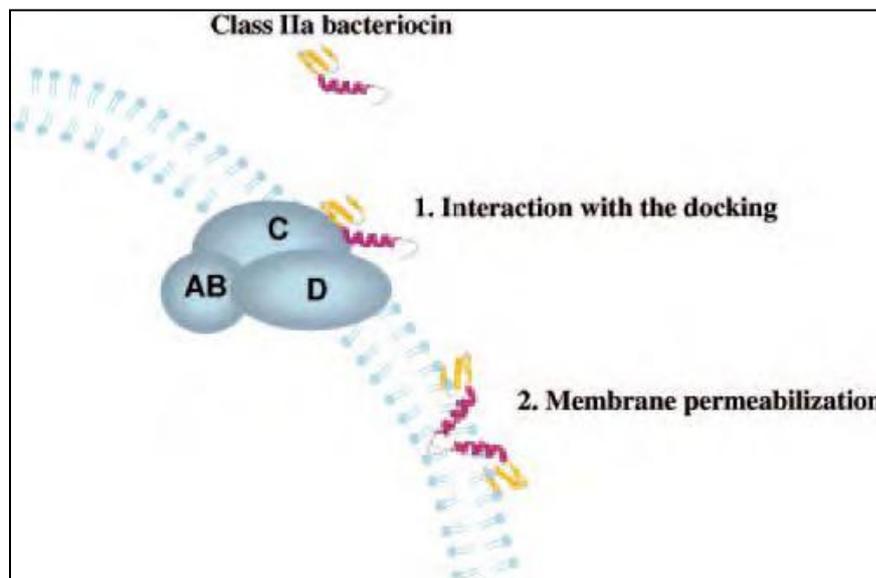
Faktor pH media berpengaruh terhadap pertumbuhan sel bakteri sehingga mempengaruhi produksi bakteriosin. Produksi bakteriosin meningkat dengan meningkatnya pH hingga pH optimum, selanjutnya mengalami penurunan. Sementara itu faktor suhu berpengaruh terhadap meningkatnya produksi bakteriosin sekaligus dapat membunuh BAL yang

bersangkutan. Suhu optimum merupakan batas keduanya (22), yaitu peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi bakteriosin. Pertumbuhan BAL mengalami peningkatan dengan meningkatnya waktu inkubasi. Peningkatan ini berlangsung secara logaritmik, meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan meningkat selanjutnya turun setelah mencapai fase stasioner (20).

Sutriswati (2001) dalam penelitiannya menemukan bakteriosin tetap stabil pada pemanasan suhu 100°C selama 30 menit, dan terjadi penurunan aktivitas sebesar 20% dan 60%-nya pada pemanasan suhu 121°C selama pemanasan masing-masing 5 dan 15 menit. Aktivitas antibakteri bakteriosin tetap stabil pada penyimpanan suhu 4°C maupun pada pembekuan (-20 dan -40°C). Komponen antibakteri ini juga tetap stabil pada berbagai pH (2-9) (23).

Target kerja bakteriosin asal bakteri asam laktat adalah membran sitoplasma sel bakteri sensitif (Venema *et al.*, 1993) sehingga dapat menimbulkan akibat fatal bagi kelangsungan hidup sel tersebut. Semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma yang bersifat selektifpermeable, melakukan pengangkutan aktif, sehingga berperan dalam mengendalikan komponen dalam sel. Apabila integritas fungsi sel sitoplasma terganggu maka substansi yang terdapat di dalam sel akan lolos dari sel sehingga menimbulkan kerusakan atau kematian sel (Drider

*et al.*, 2006). Mekanisme aksi penghambatan bakteriosin terhadap bakteri target dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme aksi Bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen (Drider et al., 2006)

## II.6 Analisis Kuantitatif Mikroorganisme (24)

Dalam analisis kuantitatif mikroorganisme ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk menghitung atau mengukur jumlah mikroorganisme di dalam suatu bahan atau sediaan farmasi, makanan minuman dan kosmetika. Cara tersebut dapat dibedakan sebagai berikut :

### 1. Perhitungan jumlah sel

- Hitung mikroskopik
- Hitung cawan
- Dengan metode MPN (Most Probable Number)

### 2. Perhitungan massa sel secara langsung

- Volumetrik
- Gravimetrik
- Kekeruhan atau turbidimetri

### 3. Perhitungan massa sel secara tidak langsung

- Analisis komponen sel (protein, DNA, ATP dan sebagainya)
- Analisis produk katabolisme (metabolit primer atau sekunder, panas)
- Analisis konsumsi nutrient (karbon, nitrogen, oksigen, asam amino, mineral dan sebagainya).

#### **II.6.1 Perhitungan Massa Sel Secara Langsung dan Tidak Langsung**

Perhitungan massa baik secara langsung maupun dengan tidak langsung memerlukan sarana dan prasarana serta keterampilan dari analisanya, sehingga cara ini jarang dilakukan, hanya sering digunakan dalam pengukuran pertumbuhan mikroorganisme dan dalam industri mikrobiologi. Pada analisis massa sel secara langsung jumlah massa sel mikroorganisme dapat digunakan apabila medium pertumbuhannya tidak mengganggu dalam pengukuran. Oleh sebab itu, apabila substrat tempat pertumbuhan mikroorganisme mengandung padatan maka sel mikroorganisme tidak dapat diukur karena mengganggu pada pengukuran dengan metode volumetrik dan gravimetrik maupun secara turbidimetrik.

#### **II.6.2 Perhitungan Jumlah Sel Metode Hitung Cawan**

Prinsip metode ini adalah apabila ada satu sel mikroorganisme yang masih hidup ditumbuhkan pada medium yang sesuai, maka sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat

langsung dan dihitung dengan mata pada media yang digunakan setelah dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Metode cawan ini merupakan metode yang paling sensitif untuk menentukan jumlah mikroorganisme karena beberapa alasan :

1. Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung
2. Beberapa jenis mikroorganisme dapat dihitung sekaligus
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroorganisme, karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari sel yang mempunyai penampakan pertumbuhan yang spesifik.

Selain dari keuntungan-keuntungan tersebut di atas, metode hitung cawan ini juga mempunyai beberapa kelemahan antara lain :

1. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
2. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda.
3. Mikroorganisme yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni kompak dan jelas, tidak menyebar.
4. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi yang relatif lama sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Pada hitung cawan ini, bahan yang diperiksa yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 koloni mikroorganisme per ml atau per-gram atau per-cm (bila pengambilan contoh dilakukan pada permukaan),

memerlukan perlakuan pengenceran sebelum diinokulasikan ke dalam media agar dalam cawan petri.

Setelah masa inkubasi selesai, maka akan terbentuk koloni-koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik yang dapat dihitung adalah antara 30 – 300 koloni per cawan petri. Untuk mengantisipasi hal tersebut, maka biasanya dilakukan pengenceran dari contoh sesuai derajat kontaminasi bahan yang diperiksa. Pengenceran biasanya dilakukan dengan pengenceran secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) dan seterusnya. Sebagai larutan pengencer dapat digunakan air steril, larutan NaCl fisiologis steril 0,9%. Larutan Ringer atau larutan buffer fosfat.

Pada pengerjaan dengan hitung cawan ini dapat dilakukan dengan dua cara yang sering digunakan. Yaitu dengan cara metode tuang atau taburan (pour plate) dan metode permukaan, sebar atau surface atau spread plate. Pada metode taburan atau tuang sejumlah contoh dari pengenceran yang dikehendaki diinokulasikan ke dalam cawan petri steril dan selanjutnya ditambahkan medium agar cair dengan suhu kurang lebih  $40 - 45^{\circ}\text{C}$ , sebanyak 15 – 20 ml. Kemudian dihomogenkan, dibiarkan sampai memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu tertentu dengan cara terbalik. Sedangkan untuk metode permukaan medium agar cair dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 – 20 ml, dibiarkan sampai memadat dan kemudian diinokulasikan contoh yang akan dianalisis sebanyak 1 ml atau 0,1 ml. Contoh yang telah dipipet tersebut

diratakan dengan menggunakan “hockey stick” yaitu batang gelas yang dilengkungkan yang steril. Kemudian diinkubasikan pada suhu tertentu. Setelah masa inkubasi selesai dilakukan pengamatan dan perhitungan koloni pada cawan petri.

Jumlah koloni dalam contoh dapat dihitung sebagai berikut :

$$\begin{array}{l} \text{Koloni per ml} \\ \text{atau per gram} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Jumlah koloni} \\ \text{per cawan petri} \end{array} \times \frac{1}{\text{Faktor pengencer}}$$

Untuk pelaporan hasil analisis mikrobiologiknya dapat digunakan sesuai “Standard Plate Count” atau SPC sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300
2. Beberapa koloni bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Pada perhitungan dengan menggunakan Standard Plate Count (SPC), untuk pelaporan dan perhitungan koloni dilakukan sebagai berikut :

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yaitu angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Apabila pada angka ketiga sama tau lebih besar dari 5, maka dibulatkan ke atas atau lebih tinggi, demikian pula sebaliknya bila angka ketiga lebih kecil dari 5, maka dibulatkan ke bawah.

2. Apabila pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 pada cawan petri, maka hasilnya adalah jumlah koloni pada cawan petri terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30, dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlahnya yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
3. Apabila semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah (masih pekat), oleh karena itu jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 koloni dikalikan dengan faktor pengencerannya, tetapi jumlah yang sebenarnya tetap ditulis dalam tanda kurung.
4. Apabila ada dua cawan petri yang menghasilkan jumlah koloni antara 30 – 300 dan perbandingan antara hasil pengenceran tertinggi dan terendah lebih kecil atau sama dengan 2, maka tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya dan dilaporkan adalah pada pengenceran terendah (encer). Apabila hasilnya lebih besar dari 2, maka dilaporkan pada pengenceran yang tertinggi (pekat).
5. Apabila digunakan dua cawan petri (duplo) pengenceran, maka data diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh hanya diambil satu cawan petri. Oleh karena itu harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan petri duplo dengan koloni di antara 30 – 300