

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOSIN YANG DIHASILKAN OLEH *Leuconostoc mesenteroides* SM 22

[Extraction and Characterization of Bacteriocin Produced by
Leuconostoc mesenteroides SM 22]

Darmawan Ari Nugroho dan Endang S. Rahayu

Staf Pengajar FATETA-UGM, Jl. Sosio Yustisia Bulaksumur Yogyakarta 55281

Diterima 20 Januari 2003 / Disetujui 12 Desember 2003

ABSTRACT

Bacteriocin produced by lactic acid bacteria has potential as food biopreservative due to their capability to control spoilage and pathogenic food borne bacteria. Previous studies showed that extraction of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 using adsorption-desorption method was not optimal. The objectives of this research were (1) to increase the effectiveness of bacteriocin extraction using adsorption-desorption method by the addition of heated biomass of *Leuconostoc* SM 22 in various concentration during adsorption (2) to characterize the bacteriocin of *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 on its stability during heat treatment, during cool storage and its spectrum activity against pathogenic bacteria.

Result of this research showed that bacteriocin activity obtained from extraction with no addition of heated biomass was 1000 AU/ml, while by addition of heated biomass of 2 to 3 times of original concentration (OD) were 2000 AU/ml. Therefore it was suggested that addition of heated biomass of *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 during adsorption-desorption with 2 times of original concentration (OD) was able to increase the bacteriocin obtained.

Bacteriocin with original activity of 2000 AU/ml, was stable (no reduction activity) after heated at 100°C for 30 minutes, but slightly decrease after heated at 121°C for 5 minutes and 121°C for 15 minutes, that were 1600 AU/ml and 800 AU/ml respectively. Bacteriocin of *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 was stable during 8 weeks storage at refrigerator (4°C), freezer -20°C and -40°C. This bacteriocin has a wide spectrum of activity showed by its ability to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella* and psychrophilic bacteria isolated from milk and isolated from meat.

Key words : Bacteriosin, *leuconostoc mesenteroides*

PENDAHULUAN

Penggunaan agensia pengawet kimia pada makanan walaupun dapat memperpanjang umur simpan suatu makanan namun dilain pihak keamanannya masih dipertanyakan. Residu bahan kimia yang tertinggal di dalam tubuh dapat memicu timbulnya berbagai macam penyakit yang berbahaya diantaranya kanker. Dilain pihak, bakteriosin yang diartikan sebagai polipeptida antibakteri kini merupakan pilihan sebagai agensia pengawet alami (Daeschel, 1989; Delves-Boughton, 1990).

Penggunaan bakteriosin sebagai pengawet alami dalam makanan perlu mempertimbangkan pula sifat-sifat bakteriosin tersebut mengingat dalam pengolahan makanan sering melibatkan suhu tinggi, suhu rendah, pengeringan, penyimpanan yang lama, dsb. Dari penelitian sebelumnya (Rahayu et al, 1999, 2000) telah diperoleh isolat *Leuconostoc mesenteroides* SM-22 yang mampu memproduksi bakteriosin. Pada penelitian ini dipelajari karakterisasi bakteriosin terutama stabilitasnya terhadap

penyimpanan suhu dingin, perlakuan suhu tinggi, spektrum penghambatan dan penggunaan sel mati untuk ekstraksi bakteriosin.

METODOLOGI

Kultur bakteri

Kultur yang digunakan adalah *Leuconostoc mesenteroides* SM22 penghasil bakteriosin (Rahayu et al, 1999, 2000). Sebagai bakteri indikator untuk uji bakteriosin digunakan *Lactobacillus plantarum* NCDO-955, untuk uji spektrum penghambatan bakteriosin digunakan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella thypimurium* FNCC 0050, *Vibrio parahaemolyticus* JCM 2147, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Shigella* sp., dan bakteri psikrofilik yang diisolasi dari daging (RK-1) dan susu segar (NR-2). Kultur diperoleh dari *Food and Nutrition Culture Collection* (FNCC), Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada.

Pembuatan kultur stok masing-masing bakteri dilakukan dengan menambahkan 10 % susu skim dan 20 % gliserol steril pada biomassa-sel hasil sentrifugasi pada *cryo-tubes* dan dilanjutkan dengan penyimpanan pada suhu - 40 °C. Untuk peremajaan, kultur bakteri asam laktat ditumbuhkan pada media pepton glukosa yeast ekstrak (PGY) dan bakteri uji pada media nutrient cair.

Produksi biomassa

Media yang digunakan untuk produksi bakteriosin adalah tripton glukos agar (TGE). Fermentasi dilakukan dengan menggunakan fermentor berkapasitas 3 liter dengan volume media 1000 ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 18 jam.

Ekstraksi bakteriosin dan penambahan massa sel

Ekstraksi bakteriosin dilakukan menggunakan metoda adsorpsi-desorpsi. Prinsip metode ini adalah pada pH sekitar netral bakteriosin akan menempel pada permukaan sel bakteri produser, sedangkan pada pH rendah akan terjadi pelepasan bakteriosin ke lingkungannya (Yang et al, 1992). Pada penelitian ini, pH untuk adsorpsi adalah 6,8 dan pH untuk desorpsi adalah 1,5 (Rahayu et al, 2000). Caranya adalah sebagai berikut : pada akhir fermentasi pH kultur diatur 6,8 untuk desorpsi bakteriosin kedalam sel dengan menggunakan NaOH, selanjutnya dipanaskan sekitar 100°C selama 15 menit (untuk membunuh sel) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 12 jam. Setelah selesai inkubasi dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan massa sel yang tidak menyerap bakteriosin dengan supernatan. Massa sel dicuci dengan 5 mM NaPO₄, dan untuk desorpsi bakteriosin dari sel ke lingkungannya, sel diresuspendi kedalam NaCl 100 mM dengan pH 1,5 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 12 jam, dilanjutkan dengan sentrifugasi untuk memisahkan massa sel yang telah membebaskan bakteriosin dan supernatan yang membawa bakteriosin. Dengan cara ini diharapkan larutan bakteriosin tidak terkontaminasi dengan protein media. Supernatan yang membawa bakteriosin selanjutnya diuji aktivitas bakteriosinnya. Pada penelitian ini juga dilakukan penambahan massa sel yang telah dihilangkan aktivitas antibakteri dan dimatikan yang ditujukan untuk meningkatkan ekstraksi bakteriosin saat dilakukan desorpsi. Penambahan massa sel tersebut menggunakan variasi OD sebanyak 1X, 2X dan 3X dari OD mula-mula.

Uji aktivitas antibakteri

Metoda yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metoda difusi agar, caranya adalah : 5 ml medium TGE agar keras (50°C) dituangkan kedalam

cawan Petri dan dibiarkan memadat, kemudian TGE agar lunak yang telah diinokulasi dengan 5 µl bakteri indikator umur 24 jam (jumlahnya sekitar 10⁵-10⁶ koloni) dituangkan diatasnya dan selanjutnya didiamkan pada suhu 4°C selama 1 jam. Langkah selanjutnya adalah ditetaskan sebanyak 5 µl larutan bakteriosin yang telah diencerkan pada berbagai level diatas TGE agar lunak yang telah didiamkan selama 1 jam tadi. Serial pengenceran ditujukan untuk mengetahui besarnya aktivitas penghambatan dari bakteriosin tersebut. Setelah larutan bakteriosin ditetaskan pada permukaan TGE agar, selanjutnya didiamkan terlebih dahulu pada suhu 4°C selama 1 jam dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Aktivitas penghambatan dinyatakan dengan *Activity Unit* (AU/ml), yaitu setara dengan pengenceran tertinggi bakteriosin yang masih menunjukkan adanya aktivitas penghambatan (zona jernih). Misalnya pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan zona jernih adalah 50x, maka besarnya aktivitas antibakteri adalah 1000/5 µl x 50 = 10.000 AU/ml (Bhunja et al, 1988 dan Biswas et al, 1991). Bakteri indikator yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus plantarum* NCDO-955.

Stabilitas bakteriosin terhadap suhu tinggi

Uji ini dilakukan dengan memanaskan larutan bakteriosin dengan konsentrasi tertentu pada (a) 100°C selama 30 menit (b) 121°C selama 5 menit dan (c) 100°C selama 15 menit. Larutan bakteriosin ini selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan metoda difusi agar.

Stabilitas bakteriosin terhadap penyimpanan suhu rendah dan suhu beku

Uji stabilitas ini dilakukan dengan menyimpan bakteriosin dengan konsentrasi tertentu pada suhu (a) 4°C (b) -20°C dan (c) -40°C selama 2 bulan. Larutan bakteriosin yang telah diperlakukan dengan suhu rendah dan suhu beku ini selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metoda difusi agar.

Spektrum bakteriosin

Untuk mengetahui spektrum penghambatan bakteriosin SM-22 ini digunakan beberapa jenis bakteri patogen yaitu *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Shigella* sp., *Salmonella thypimurium* FNCC 0050, *Vibrio parahaemolyticus* JCM 2147, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dan bakteri psikrofilik yang diisolasi dari daging (RK-1) dan susu segar (NR-2)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambahan massa sel untuk ekstraksi bakteriosin

Pada penelitian ini untuk adsorpsi bakteriosin dilakukan dengan penambahan masa sel yang telah dimatikan dengan tujuan untuk meningkatkan ekstraksi bakteriosin. Semakin banyak massa sel yang ditambahkan pada kultur maka sisi yang dapat menyerap bakteriosin semakin banyak sehingga lebih efektif untuk adsorpsi bakteriosin. Pada penelitian ini massa sel yang digunakan untuk adsorpsi bakteriosin adalah sel produser yang telah dimatikan terlebih dahulu (dengan pemanasan 100°C selama 15 menit) dan dipastikan bahwa sel telah membebaskan seluruh bakteriosin yang diproduksinya. Dari hasil penelitian ternyata diperoleh bahwa dengan penambahan sel untuk adsorpsi ternyata sampai dengan konsentrasi tertentu dapat meningkatkan efektivitas ekstraksi. Data menunjukkan bahwa ekstraksi tanpa penambahan massa sel diperoleh aktivitas bakteriosin sebesar 1000 AU/ml, namun dengan penambahan massa sel untuk adsorpsi sampai OD 2X dan 3X nya diperoleh hasil ekstraksi bakteriosin sebesar 2000 AU/ml atau meningkat sebanyak 2 kalinya. Data juga menunjukkan bahwa penambahan massa sel sampai OD 3X tidak memberikan peningkatan hasil ekstraksi, hal ini menunjukkan bahwa penambahan massa sel hanya sampai pada konsentrasi tertentu saja, penambahan berikutnya tidak meningkatkan ekstraksi bakteriosin.

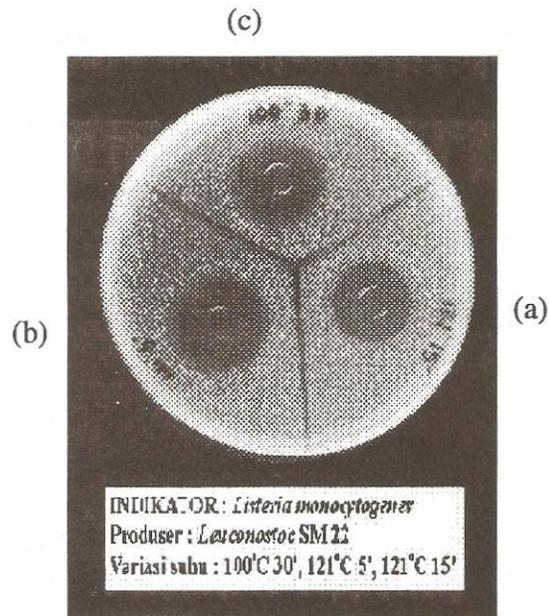
Stabilitas pada suhu tinggi, suhu rendah dan suhu beku

Penelitian mengenai stabilitas bakteriosin pada suhu tinggi, suhu rendah dan suhu beku sangat penting untuk dikaji terutama apabila bakteriosin akan diaplikasikan pada bahan makanan. Data yang diperoleh dari penelitian ini didapatkan bahwa bakteriosin yang diproduksi *Leuconostoc mesenteroides* SM 22 tidak kehilangan aktivitas antibakterinya setelah dipanaskan 100°C selama 30 menit, namun demikian dengan pemanasan pada suhu yang lebih tinggi yaitu 121°C selama 5 menit terjadi penurunan aktivitas sebesar 20%-nya, sedangkan dengan pemanasan 121°C selama 15 menit aktivitas berkurang sebesar 60%.

Gambar 1 menunjukkan aktivitas bakteriosin SM-22 setelah dipanaskan pada berbagai suhu dan waktu terhadap pertumbuhan bakteri *Listeria monocytogenes*.

Stabilitas bakteriosin SM-22 terhadap panas ini sangat menguntungkan karena bakteriosin ini dapat dilibatkan dalam pengolahan pangan yang menggunakan suhu tinggi selama proses pengolahannya. Stabilitas ini diduga berkaitan dengan BM dari bakteriosin SM-22 yang

rendah, yaitu 3.331 Dalton (Rahayu et al, 2000). Seperti dikemukakan Ray (1992) bahwa bakteriosin merupakan peptida rantai pendek yang stabil terhadap panas. Dugaan lain bahwa adanya asam amino sistein yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari proses pemanasan. Penyimpanan bakteriosin SM-22 pada suhu 4°C, -20°C dan -40°C selama 8 minggu tidak menurunkan aktivitas antibakteri dari bakteriosin.



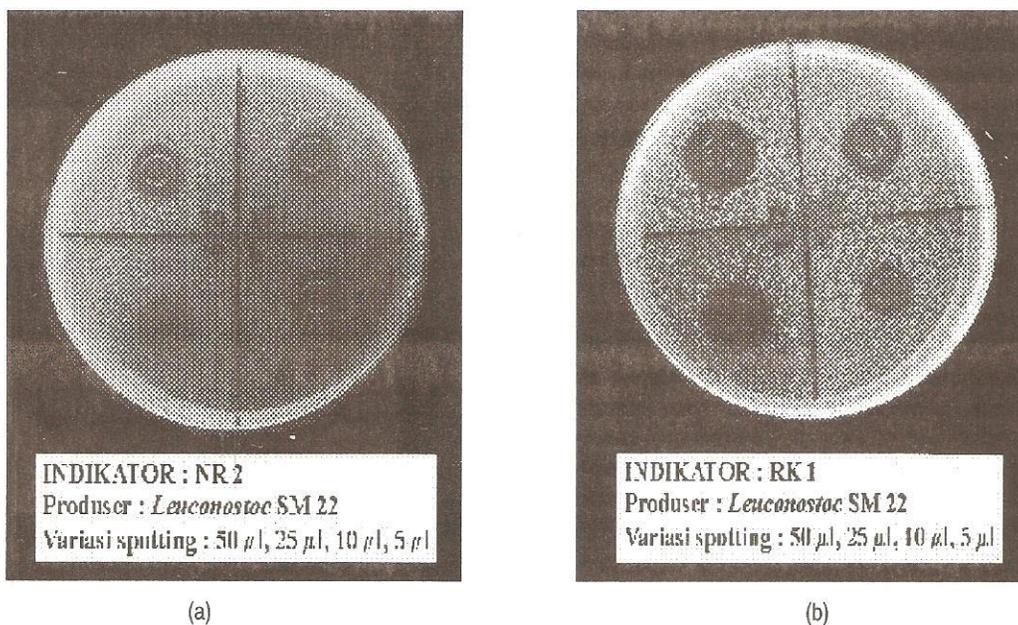
Gambar 1. Aktivitas bakteriosin SM-22 terhadap *Listeria monocytogenes* setelah perlakuan pemanasan (a) 100°C selama 30 menit; (b) 121°C selama 5 menit; dan (c) 121°C selama 15 menit.

Spektrum penghambatan bakteriosin

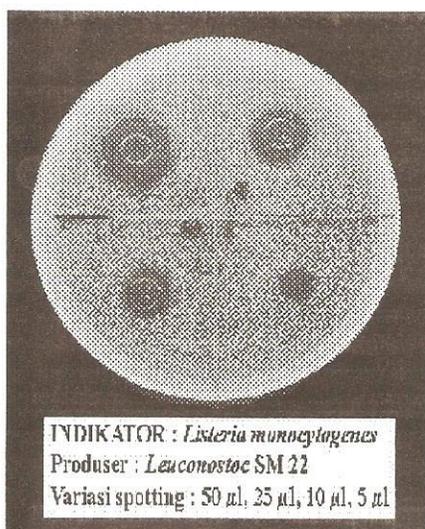
Pada penelitian ini dilakukan uji antibakteri bakteriosin SM-22 terhadap sejumlah bakteri patogen maupun bakteri psikrofilik. Data menunjukkan bahwa bakteriosin ini mampu menghambat seluruh bakteri patogen dan psikrofilik yang diujikan dengan kekuatan yang berbeda-beda.

Gambar 2 menunjukkan daya hambat bakteriosin SM-22 terhadap bakteri psikrofilik NR-2 (diisolasi dari susu segar) dan RK-1 (diisolasi dari daging segar) pada berbagai konsentrasi.

Dari hasil menunjukkan bahwa spektrum bakteriosin SM-22 cukup luas yaitu meliputi Gram negatif (*Salmonella thymurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella*) dan Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*).



Gambar 2. Aktivitas bakteriosin SM-22 dalam menghambat bakteri psikrofilik (a) NR-2 (diisolasi dari susu segar); (b) RK-1 (diisolasi dari daging yang disimpan dingin) dengan volume 50 μ l, 25 μ l, 10 μ l dan 5 μ l.



Gambar 3. Aktivitas bakteriosin terhadap *Listeria monocytogenes* pada berbagai volume (50 μ l, 25 μ l, 10 μ l dan 5 μ l)

KESIMPULAN

Penambahan massa sel dapat meningkatkan ekstraksi bakteriosin dengan menggunakan metoda adsorpsi desorpsi. Bakteriosin yang dihasilkan oleh

Leuconostoc mesenteroides SM-22 memiliki stabilitas terhadap perlakuan suhu tinggi, suhu rendah, dan suhu pembekuan. Spektrum penghambatannya cukup luas mencakup bakteri Gram positif dan negatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, melalui Proyek Hibah Bersaing VIII/2 (2001).

DAFTAR PUSTAKA

- Biswas, S.R.; Ray, P.; Johnson, M.C. dan Ray, B. 1991. Influence of Growth Condition on the Production of a Bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* with Broad inhibitory Spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 57 (4): 1265-1267.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., and Ray, B. 1988. Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of A Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65:261.

- Daeschel, M.A. 1989.** Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43(1):164-167.
- Delves-Broughton, J. 1990.** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 51(11):100-106, 112 and 117.
- Rahayu, E.S., A. Ekasari, A.K. Wardhani, dan S. Margino. 1999.** Skrining Bakteri Asam laktat dari Daging dan Produk Olahannya sebagai Penghasil Bakteriosin. Prosiding Seminar Nasional Pangan, Yogyakarta, 14 September 1999.
- Rahayu, E.S., Margino, S., Kusnadi, J., dan Harmayani, E. 2000.** Produksi Bakteriosin oleh *Leuconostoc* SM 22 dan Aplikasinya Sebagai Bahan Pengawet Makanan yang Didinginkan. Laporan Hibah Bersaing Perguruan Tinggi, Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ray, B. 1992.** Pediocin(s) of *Pediococcus acidilactici* as a Food Biopreservative. In *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Ray, B and M. Daeschel. (eds). CRC Press, Inc., Florida.
- Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992.** Novel Method to Extract Large Amount of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:3355-3359