



Skrining Bakteriosin dari beberapa Galur Bakteri Asam Laktat Isolat Lokal Genus *Streptococcus* dan *Weissella*

(Screening of Bacteriocin from Some Locally-Isolated Strains Lactic Acid Bacteria of genus *Streptococcus* and *Weissella*)

RAFIKA SARI, CESILIA ANITA, MAKSUM RADJI, AMARILA MALIK*

Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Indonesia, Depok, Indonesia.

Diterima 28 Februari 2011, Disetujui 18 Maret 2011

Abstrak: Banyak bakteri asam laktat (BAL) yang telah diketahui memproduksi peptida antimikroba yang dikenal sebagai bakteriosin. Bakteriosin adalah suatu peptida antimikroba yang disintesis oleh ribosom yang mampu membunuh bakteri yang sekerabat. Bakteri yang memproduksi bakteriosin diketahui pula memproduksi protein imunitas bakteriosin (bip). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas bakteriosin yang selanjutnya akan diarahkan untuk mengisolasi bakteriosin dan protein imunitasnya. Di dalam penelitian ini genus *Streptococcus* and *Weissella* yang diperoleh dari sumber koleksi BAL telah diskining menggunakan cara well diffusion agar untuk esei antagonisme. Pengamatan zona hambat pertumbuhan pada esei antagonisme dilakukan dengan menggunakan bakteri-bakteri indikator *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, dan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156. Setelah esei skringing awal tersebut maka enzim-enzim protease K, katalase dan tripsin digunakan untuk uji konfirmasi. Hasil menunjukkan bahwa baik *Strep. macedonicus* MBF10-2 maupun *W. confusa* MBF8-1 mempunyai kemampuan aktivitas bakteriosin walaupun hanya terhadap kedua bakteri indikator *Leu. mesenteroides* galur-galur TISTR 120 dan JCM 6124.

Kata kunci: bakteriosin, bakteri asam laktat, protein imunitas bakteriosin, *Streptococcus*, *Weissella*.

Abstract: Many lactic acid bacteria (LAB) are known to produce antimicrobial peptides, termed bacteriocins. Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides which kill closely related bacteria. Bacteria producing bacteriocin are also known to produce bacteriocin immunity protein (bip). This study aimed to identify bacteriocins activity in an attempt to isolate the bacteriocin and the bip. In this study, genus *Streptococcus* and *Weissella* from our LAB collection were screened on well diffusion agar for antagonism assay. Growth inhibition zone observation has been carried out by antagonism assay using *Leu. mesenteroides* TISTR 120, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, and *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 as indicator strains. Protease K, catalase, and trypsin were also used following the first screening assay for confirmation test. Results showed that both *Strep. macedonicus* MBF10-2 and *W. confusa* MBF8-1 posses bacteriocin activity although both against *Leu. mesenteroides* only, the TISTR 120 and JCM 6124 indicator strains.

Keywords: bacteriocin, lactic acid bacteria, bacteriocin immunity protein, *Streptococcus*, *Weissella*.

PENDAHULUAN

BAKTERI Asam laktat (BAL) menghasilkan senyawa

* Penulis korespondensi, Hp. 0816751775
e-mail: amarila.malik@gmail.com

laktat yang telah digunakan sejak 1895 dalam bioindustri sebagai pengawet karena memiliki aktivitas antimikroba dan secara alami dapat melindungi produk fermentasi dari kerusakan. Selain itu, BAL yang dikenal sebagai mikroorganisme *Generally Recognized As Safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang dapat ditambahkan pada



makanan dan tidak mempengaruhi mikroba alami lain yang terdapat didalam tubuh, juga menghasilkan peptida antimikroba lain yang disekresikan yaitu bakteriosin⁽¹⁾.

Sejak 1990 penelitian bakteriosin BAL telah berkembang pesat dan telah berhasil ditemukan berbagai protein/peptida bakteriosin. Bakteriosin dari BAL nampaknya dihasilkan oleh bakteri yang bersangkutan dengan tujuan sebagai penghambat terhadap sesama BAL di dalam lingkungan ekologi yang saling berkompetisi. Namun telah banyak dilaporkan pula bahwa bakteriosin BAL menunjukkan aktivitas terhadap sejumlah bakteri pembusuk makanan ataupun patogen dari kelompok Gram positif, antara lain *Listeria*⁽¹⁾. Bakteriosin menjadi perhatian karena aplikasinya sebagai pengawet makanan alami dan bahkan pengembangan sebagai antibiotik, sebagai contoh lactocin 160 telah diujikan aplikasinya sebagai terapi antimikroba pada keadaan vaginosis akibat bakteri (*bacterial vaginosis*)⁽²⁾.

Bakteriosin dapat diklasifikasikan menjadi kelas I, kelas II a, II b, II c, II d, dan kelas III. Bakteriosin kelas I disebut lantibiotik, berupa peptida kecil berukuran kurang dari 5 kDa, mengandung asam amino alami yaitu lanthionin termasuk di dalamnya adalah nisin⁽³⁾. Bakteriosin kelas II merupakan bakteriosin non lantibiotik, berupa protein kecil berukuran kurang dari 10 kDa, tahan terhadap panas, memiliki spektrum aktivitas sempit. Bakteriosin kelas II dibagi menjadi beberapa subkelas yaitu bakteriosin kelas II a, II b, II c, dan II d. Bakteriosin kelas II a merupakan bakteriosin yang paling umum, stabil terhadap panas, dan aktif terhadap genus *Listeria/Listerisid* (bakteriosin mirip pediocin) memiliki urutan asam amino didaerah N-terminal yang serupa YGNGVXC. Bakteriosin kelas II b merupakan bakteriosin yang terdiri dari dua buah peptida yang tidak termodifikasi karena mengandung dua peptida yang berbeda satu sama lain, terdapat dalam jumlah yang sama, membentuk pori pada membran sel target, dan mengganggu gradien proton dari sel target. Bakteriosin kelas II c mempunyai efek yang luas pada permeabilitas membran, terdiri dari satu peptida dan berbentuk siklik, sedangkan bakteriosin II d merupakan bakteriosin nonsiklik dan tidak memiliki urutan asam amino yang serupa dengan pediocin. Bakteriosin kelas III merupakan bakteriosin non-lantibiotik, berupa protein besar berukuran lebih dari 30 kDa yang tidak tahan pemanasan, berasal dari bakteriosin yang dihasilkan oleh genus *Lactobacillus*^(4,5).

Sensitivitas antimikroba bakteriosin bakteri asam laktat dimodulasi adanya protein imunitas bakteriosin. Protein imunitas merupakan protein terakumulasi yang dihasilkan agen antimikroba melalui sekresi intraseluler. Gen bakteriosin dikode bersama dengan gen imunitas karena merupakan satu grup gen (*quorum sensing*). Melalui sistem tersebut sel

bakteri dapat tetap bertahan dan terus tumbuh serta mengatur ekspresi bakteriosin termasuk melindungi bakteri penghasil bakteriosin dari bakteriosin yang dihasilkannya⁽⁶⁾. Protein imunitas bakteri kini menjadi perhatian para peneliti karena berpotensi untuk dikembangkan sebagai agens kemoterapi mikroba, yaitu sebagai komplemen antibiotik yang telah banyak digunakan dengan tujuan meningkatkan efektivitasnya. Penelitian mengenai peranan protein imunitas bakteri ini sebagai antimikroba telah dilaporkan, yaitu menunjukkan terjadinya peningkatan efektivitas penggunaan triklosan terhadap bakteri utama penyebab karang gigi yaitu *Streptococcus mutans*⁽⁷⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat isolat lokal genus *Streptococcus* dan *Weissella* terhadap berbagai bakteri indikator. Aktivitas antimikroba masing-masing galur dikarakterisasi berdasarkan pengaruh penambahan enzim, pH, dan suhu inkubasi. Penentuan potensi aktivitas bakteriosin dari kedua galur juga diuji dengan melakukan metode dilusi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bakteri yang digunakan. Bakteri uji adalah galur-galur BAL yang digunakan dalam skrining penghasil antimikroba dengan uji aktivitas bakteriosin. Bakteri-bakteri yang digunakan adalah koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Universitas Indonesia, yaitu *Streptococcus macedonicus* MBF10-2; *Weissella confusa* MBF8-1, MBFCNC2(1), MBFPDG10(1), dan MBF8-2; *Weissella cibaria* MBFBJG5(1), MBFWRS3, dan MBFCNC11^(8,9,10).

Bakteri-bakteri indikator adalah mikroba yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba meliputi *Leu. mesenteroides* TISTR 120 (koleksi Universitas Indonesia Culture Collection-UICC), *Leu. mesenteroides* JCM 6124 (koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Universitas Indonesia, pemberian Prof. N. Ogasawara, Nara Institute of Science and Technology-NAIST, Jepang), *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, dan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156 (diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada-UGM).

Medium. Medium yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah MRS (de Man Rogosa Sharpe)⁽¹¹⁾[Difco,USA]. Media pengujian aktivitas yang digunakan adalah media modifikasi MRS dan media NA [Difco,USA].

METODE. Penyiapan inokulum bakteri

indikator. Kultur bakteri indikator diencerkan ke dalam 5.0 mL larutan NaCl 0.9%, kemudian di vortex hingga homogen sampai tingkat kekeruhan setara dengan larutan standar Mc Farland III yaitu setara dengan 10^9 sel bakteri/mL. Sebanyak 1.0 mL suspensi bakteri diencerkan dengan penambahan 9.0 mL larutan NaCl 0.9% untuk menghasilkan inokulum 10^8 bakteri/mL.

Uji aktivitas substansi penghambat. Sebanyak 50 μ L kultur cair 24 jam bakteri-bakteri uji disentrifugasi singkat, kemudian pelet diresuspendi. Resuspensi pelet tersebut diambil dengan ose steril, kemudian ditusukkan pada agar MRS di cawan petri yang telah mengandung masing-masing bakteri indikator sebanyak 2 tusukan di tempat yang sama⁽¹²⁾. Media yang dipersiapkan yaitu media MRS yang terdiri dari media *base layer* dan *seed layer*. Media *base layer* dibuat dengan penambahan konsentrasi *Bacto Agar* [Difco, USA] sebanyak 1.5 % ke dalam media MRS [Difco, USA], sedangkan media *seed layer* menggunakan penambahan *Bacto agar* [Difco, USA] sebanyak 0.7 %. Sebanyak 1 mL inokulum bakteri indikator 10^7 bakteri/ml dicampur homogen dengan 4 mL media *seed layer* MRS untuk bakteri indikator galur *Leu. mesenteroides*, dan media NA untuk bakteri indikator lainnya kemudian dituang merata di atas permukaan media *base layer*. Inkubasi dilakukan pada suhu yang sesuai dengan pertumbuhan masing-masing bakteri indikator selama 24 jam, yaitu suhu 32 °C untuk bakteri-bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124, serta suhu 37 °C untuk bakteri-bakteri indikator lainnya. Zona hambatan yang terbentuk dinyatakan dengan positif atau negatif, dan hasil pengamatan didokumentasikan dengan scanner.

Uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri indikator dengan metode difusi sumur agar. Isolat BAL ditumbuhkan dalam media MRS cair 5.0 mL, kemudian divortex hingga homogen, dan setelah itu diinkubasi pada suhu 32 °C selama 24 jam. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 1600 x g pada suhu 4 °C selama 15 menit. Filtrat dinetralkan hingga pH 6.0 menggunakan pH Meter (Eutech) dengan menambahkan larutan NaOH 1 N. Filtrat disterilkan dengan filter *Millipore* berdiameter 0.22 μ m ke dalam tabung steril untuk memperoleh supernatan antimikroba. Media yang dipersiapkan sebagaimana disebutkan dalam uji aktivitas substansi penghambat di atas ini. Setelah memadat, lubang dibuat pada media agar tersebut menggunakan sumuran logam berdiameter 6 mm dan tinggi 1 cm. Sebanyak 50 μ L supernatan antimikroba dimasukkan ke dalam sumur, kemudian didiamkan selama 1 jam agar supernatan antimikroba dapat berdifusi ke dalam agar. Inkubasi dilakukan pada suhu yang sesuai dengan pertumbuhan masing-masing indikator selama 24 jam, yaitu suhu 32 °C (*Leu.*

mesenteroides TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124) dan suhu 37 °C untuk bakteri indikator lainnya. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong, dan hasil pengamatan didokumentasikan dengan scanner.

Optimasi waktu inkubasi BAL. Untuk mengetahui produksi protein antimikroba yang terbaik dilaksanakan optimasi waktu inkubasi pertumbuhan BAL uji. Optimasi dilakukan pada kultur cair dengan waktu 12, 18, 24, dan 30 jam. Setelah itu dilakukan uji aktivitas antimikroba sebagaimana tahapan disebutkan di atas ini. Zona hambat terbesar dinyatakan sebagai waktu inkubasi optimum BAL tersebut.

Uji aktivitas antimikroba setelah penambahan enzim terhadap bakteri indikator. Sebanyak 250 μ L supernatan antimikroba dicampur dengan 750 μ L enzim protease K (Sigma) konsentrasi 1 mg/mL dilarutkan dalam dapar pospat pH 7.5 kemudian diinkubasi selama 5 jam pada suhu 37 °C⁽¹³⁾. Filtrat disterilkan dengan filter *Millipore* berdiameter 0.22 μ m ke dalam tabung steril. Sebanyak 1.0 mL inokulum bakteri indikator 10^7 bakteri/mL dicampur homogen dengan 4 mL media *seed layer* MRS kemudian dituang merata di atas permukaan media *base layer*, dan selanjutnya dilakukan sebagaimana pada Uji aktivitas antimikroba. Prosedur tersebut juga dilakukan terhadap perlakuan dengan enzim katalase (Sigma) konsentrasi 1 mg/mL dilarutkan dalam dapar pospat pH 7.0 dan tripsin (Sigma) konsentrasi 1 mg/mL dalam dapar pospat pH 7.6, yang masing-masing diinkubasi selama 5 jam pada suhu 25 °C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak delapan bakteri indikator yang terdiri dari bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif digunakan di dalam percobaan ini. Bakteri indikator Gram positif yang digunakan adalah *Leu. mesenteroides* TISTR 120, *Leu. mesenteroides* JCM 6124, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061 dan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156. Bakteri indikator Gram negatif yang digunakan adalah *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, dan *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063. Berdasarkan hasil percobaan uji aktivitas substansi penghambat yang dihasilkan oleh delapan galur BAL yang telah di uji yaitu *Streptococcus macedonicus* MBF10-2; *Weissella confusa* MBF8-1, MBFCNC2(1), MBFPDG10(1), dan MBF8-2; *Weissella cibaria* MBFBJG5(1), MBFWRS3, dan MBFCNC11 menggunakan metode tusuk sebagaimana yang disajikan pada Tabel 1, diperoleh hasil pengamatan yang menunjukkan adanya substansi penghambat dihasilkan oleh semua bakteri uji terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM

6124 tetapi tidak menunjukkan hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Listeria monocytogenes* FNCC 0156, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, dan *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063.

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi sumur agar diperoleh tiga bakteri uji yang berpotensi menghasilkan bakteriosin yaitu *Streptococcus macedonicus* MBF10-2, *Weissella confusa* MBFCNC2(1), dan *Weissella confusa* MBF8-1 terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124. Hasil uji aktivitas disajikan pada Tabel 1.

Uji optimasi dilakukan terhadap BAL yang telah positif menghasilkan zona jernih berdasarkan uji aktivitas yang telah dilakukan. Dalam percobaan ini digunakan *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 karena menghasilkan zona jernih yang paling besar sehingga akan mempermudah dalam pengamatan. Uji optimasi dilakukan dalam waktu 12, 18, 24, dan 30 jam. Selama masa inkubasi 12 jam, galur MBF 10-2 belum terlihat tumbuh. Hal ini disebabkan bakteri masih berada dalam fase penyesuaian diri. Fase tersebut merupakan persiapan untuk fase berikutnya. Uji dilanjutkan pada waktu inkubasi 18, 24, dan 30 jam dengan suhu 32 °C. Hasil percobaan menunjukkan peningkatan diameter daerah hambat berupa zona jernih dari waktu inkubasi 18 jam dengan suhu 32 °C ke waktu inkubasi 24 jam dengan suhu 32 °C. Hal ini disebabkan bakteri berada dalam fase eksponensial yaitu jumlah bakteri meningkat secara eksponensial. Pada pertengahan fase ini pertumbuhan bakteri ideal ditandai dengan pembelahan yang terjadi secara teratur dalam keadaan seimbang. Sementara itu, perubahan waktu inkubasi 24 jam dengan suhu 32 °C ke waktu inkubasi 30 jam dengan suhu 32°C terjadi pengurangan diameter daerah hambat. Hal tersebut disebabkan bakteri mulai berada dalam fase kematian (fase lag) dimana jumlah bakteri hidup mulai berkurang, jumlah metabolit toksik meningkat

dan bakteri akan mulai memasuki fase kematian. Pada fase ini aktivitas bakteriosin telah hilang karena terdegradasi, ditandai dengan hilangnya zona jernih. Produksi bakteriosin menurun setelah diinkubasi 24 jam sesuai penelitian bakteriosin yang dihasilkan dari *Streptococcus thermophilus* terhadap bakteri Gram positif yaitu pertumbuhan optimal dihasilkan pada akhir fase pertumbuhan yaitu dalam waktu 24 jam⁽⁴⁾. Hasil pengamatan uji optimasi disajikan pada Tabel 2.

Dari ketiga kandidat yang dapat memberikan hambatan terhadap bakteri indikator dilanjutkan dengan uji konfirmasi menggunakan enzim proteolitik yaitu Protease K dan Tripsin serta menggunakan enzim Katalase. Berdasarkan uji konfirmasi diperoleh dua galur penghasil bakteriosin yaitu *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 dan *Weissella confusa* MBF8-1 yang dapat menghasilkan protein antimikroba bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124. Pemilihan dua galur tersebut berdasarkan zona jernih yang dapat di amati di lokasi sekitar sumuran yang mendapatkan perlakuan dengan enzim Katalase dibandingkan dengan kontrol supernatan dan zona jernih yang hilang sempurna pada perlakuan dengan enzim Protease K dan Tripsin. Hasil tersebut disajikan pada Tabel 3. Hasil uji konfirmasi *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 dapat diamati pada Gambar 1. Galur MBFCNC2(1) masih menunjukkan adanya zona jernih pada perlakuan dengan enzim Tripsin sehingga dinyatakan bukan merupakan galur BAL penghasil bakteriosin.

Metode tusuk digunakan sebagai seleksi awal yang dilakukan terhadap BAL yang berpotensi mempunyai aktivitas antimikroba. Metode tusuk dilakukan untuk mengetahui substansi-substansi yang dapat memberikan hambatan disebabkan senyawa peroksida, asam organik, asam-asam amino, dan bakteriosin yang dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat⁽¹²⁾. Namun ternyata substansi-substansi penghambat yang dihasilkan oleh

Tabel 1. BAL uji dan hasil skrining aktivitas bakteriosin.

Bakteri uji	Diameter zona hambat terhadap Bakteri Indikator (mm)																
	TISTR		JCM		Sa		Bs		Lm		Pa		St		Ec		
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	
<i>W. confusa</i> MBFPDG-10(1)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. confusa</i> MBFCNC-2(1)	15	+	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> MBFCNC-11	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> MBFWRS-3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> MBFBJG-5(1)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. confusa</i> MBF8-1	12	+	10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. confusa</i> MBF8-2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Strep.macedonicus</i> MBF10-2	15	+	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*TISTR = *Leu. mesenteroides* TISTR 120; JCM = *Leu. mesenteroides* JCM 6124; Sa = *Staphylococcus aureus* FNCC 0047; Bs = *Bacillus subtilis* FNCC 0061; Ec = *Escherichia coli* FNCC 0183; St = *Salmonella typhi* FNCC 0165; Pa = *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063; Lm = *Listeria monocytogenes* FNCC 0156; S = metode sumur; T= metode tusuk; + = terdapat zona hambat; - = tidak terdapat zona hambat; uji menggunakan sumuran logam diameter 6 mm tinggi 1 cm.

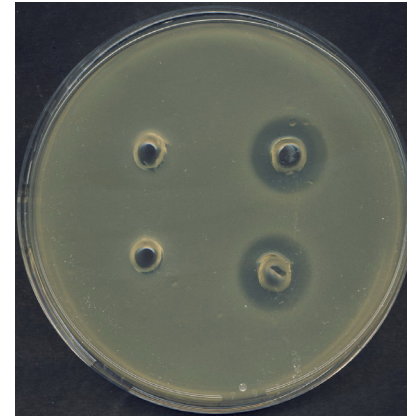
**Tabel 2. Hasil uji optimasi *Streptococcus macedonicus* MBF10-2.**

No	Waktu inkubasi	Zona hambat
1	12 jam	0
2	18 jam	15,85 mm
3	24 jam	17,65 mm
4	30 jam	17,5 mm

galur BAL menunjukkan zona hambatan berupa zona jernih hanya terhadap bakteri indikator yang memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan bakteri uji BAL yaitu bakteri Gram positif *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.

Dalam penelitian ini, pengujian aktivitas bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL genus *Streptococcus* dan *Weissella* menggunakan metode difusi sumur agar menunjukkan daerah hambatan yang dapat diamati melalui zona jernih yang dapat dipastikan bukan berasal dari asam-asam organik karena supernatan antimikroba telah dinetralkan dengan larutan NaOH. Tiga galur menunjukkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124 yaitu galur MBF10-2, galur MBF8-1, dan galur MBFCNC2⁽¹⁾, namun tidak satupun menunjukkan hambatan terhadap bakteri indikator *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Bacillus subtilis* FNCC 0061, *Escherichia coli* FNCC 0183, *Salmonella typhi* FNCC 0165, *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063, dan *Listeria monocytogenes* FNCC 0156. Hal tersebut kemungkinan disebabkan supernatan antimikroba yang dihasilkan oleh ketiga galur tersebut memiliki spektrum kerja yang sempit sehingga hanya dapat menghambat bakteri indikator dengan hubungan kekerabatan yang dekat dengan BAL yaitu *Leu. mesenteroides* sesuai dengan penelitian yang dilakukan terhadap bakteriosin lactocin 160 yang dihasilkan oleh genus *Lactobacillus* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif genus *Lactobacillus*, *Enterococcus*, dan *Clostridium*⁽²⁾.

Zona jernih yang hilang akibat perlakuan dengan enzim-enzim proteolitik seperti enzim Protease K dan Tripsin membuktikan karakteristik umum

**Gambar 1. Uji aktivitas antimikroba *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 setelah penambahan enzim terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.**

dari bakteriosin sebagai protein alami. Bakteriosin merupakan protein yang mengandung ikatan disulfida, dengan penambahan enzim proteolitik maka ikatan tersebut dirusak sehingga aktivitas bakteriosin menjadi hilang yang ditandai dengan hilangnya zona jernih. Penambahan enzim Tripsin diperlukan untuk memperkuat uji konfirmasi karena Tripsin merupakan enzim proteolitik yang bekerja paling kuat menguraikan protein⁽³⁾. Uji konfirmasi terhadap galur MBFCNC2(1) menunjukkan adanya protein selain bakteriosin yang tidak mudah dirusak oleh enzim-enzim proteolitik. Pada perlakuan dengan enzim katalase, zona jernih tetap terlihat disebabkan bakteri asam laktat yang bersifat Katalase negatif sehingga enzim yang ditambahkan hanya merusak senyawa peroksida yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Zona jernih yang muncul dengan perlakuan enzim Katalase juga membuktikan bahwa zona jernih bukan disebabkan oleh senyawa peroksida melainkan berasal dari bakteriosin.

Bakteriosin merupakan protein ekstraseluler yang memiliki aktivitas antimikroba baik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat genus *Streptococcus* telah ditemukan pada *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 yaitu bakteriosin kelas I jenis lantibiotik yang dapat menghambat mikroorganisme patogen dan mikroorganisme yang dapat menyebabkan kerusakan

Tabel 3. Uji aktivitas antimikroba setelah penambahan enzim terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.

Bakteri uji	Diameter zona hambat (mm) terhadap <i>Leu. mesenteroides</i> TISTR				Diameter zona hambat (mm) terhadap <i>Leu. mesenteroides</i> JCM 6124			
	K	P	T	Kat	K	P	T	Kat
<i>Weissella confusa</i> MBFCNC-2(1)	12	-	12	10	12	-	12	10
<i>Weissella confusa</i> MBF8-1	12	-	-	11	10	-	-	10
<i>Streptococcus macedonicus</i> MBF10-2	15	-	-	14	13	-	-	13

*K=Kontrol supernatan; P = perlakuan dengan protease K; T = perlakuan dengan tripsin; Kat = perlakuan dengan katalase; - = tidak terdapat zona hambat; uji menggunakan sumuran logam berdiameter 6 mm tinggi 1 cm.



makanan seperti *Clostridium tyrobutyricum* dan *Lactobacillus sakei* LMG 13558⁽¹⁶⁾. Nisin merupakan golongan bakteriosin lantibiotik yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif. Aktivitas antimikroba bakteriosin terjadi melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel dengan berikatan pada reseptor spesifik di permukaan sel^(2,3). Demikian juga bakteriosin dari genus *Weissella* baru pertama kali ditemukan pada tahun 2007 yaitu pada *Weissella cibaria* yang diisolasi dari plaa-som, suatu makanan fermentasi dari Thailand, yaitu Weissellicin 110⁽⁵⁾. Weissellicin 110 merupakan bakteriosin kelas II namun tidak seperti bakteriosin kelas II lainnya, weissellicin 110 hanya dapat menghambat bakteri indikator *Lactobacillus sakei* JCM 117 yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan bakteri penghasil dan tidak dapat menghambat *Listeria monocytogenes*. Weissellicin 110 terdegradasi secara sempurna oleh enzim-enzim proteolitik misalnya Protease K dan Tripsin. Weissellicin 110 berspektrum sempit yaitu dapat menghambat BAL dengan hubungan kekerabatan dekat serta telah dikembangkan sebagai pengawet dalam makanan seperti halnya nisin.

Perolehan aktivitas bakteriosin dari bakteri asam laktat koleksi lokal ini akan menjadi kandidat untuk penelitian berikutnya untuk mengisolasi bakteriosin maupun protein imunitas bakteriosin. Kedua jenis protein antimikroba ini akan berpotensi untuk dikembangkan sebagai antimikroba terutama untuk pangan, namun juga berpotensi dikembangkan sebagai komplemen antibiotik yang sudah ada agar dapat dikembangkan menjadi lebih efektif dari khasiatnya saat ini.

SIMPULAN

Streptococcus macedonicus MBF10-2 dan *Weissella confusa* MBF8-1 mempunyai kemampuan menghasilkan bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri indikator *Leu. mesenteroides* TISTR 120 dan *Leu. mesenteroides* JCM 6124.

DAFTAR PUSTAKA

1. Eijsink VGH, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H, Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuw*. 2002. 81: 639–54.
2. Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Safety study of an antimicrobial peptide lactocin 160 produced by the vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2007. 2007:78248 (DOI: 10.1155/2007/78248).
3. Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen L, Prevost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 2006. 70(2): 564-82.
4. Cuozzo SA, Castellano, Sesma FJM, Vignolo GM, Raya RR. Differential roles of the two-component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity. *Curr Microbiol*. 2003. 46:180-3.
5. Sriannual S, Yanagida F, Lin L, Hsiao K, Chen Y. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaa-Som, a fermented fish product from Thailand. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73(7): 1-4.
6. Seppo S, Wright AV, Ouwenhand A. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. 3rd edition. New York: Marcel Dekker Inc; 2004. 1-12.
7. Matsumoto M, Kuramitsu H. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006. 188(23): 8095-102.
8. Malik A, Felicia, Radji M, Oetari A. Skrining, isolasi, dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida menggunakan gen penyandi 16S ribosomal RNA. *Sains Indonesia*. 2007. 12:1-6.
9. Malik A, Radji M, Kralj S, Dijkhuizen L. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol Lett*. 2009. 300:131-8.
10. Malik A, Hermawati AK, Hestiningtyas M, Soemiati A, Radji A. Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukansukrase dari makanan dan minuman mengandung gula. *Makara (Seri Sains)*. 2010. 14:57-62.
11. DeMan JC, Rogosa M, Sharp ME. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol*. 1960. 23(1):130-8.
12. Kusmiati, Malik A. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac 1 pada berbagai media. *Makara (Kesehatan)*. 2002. 6: 1-7.
13. Campo RD, Tenorio C, Rufi zo J-D, Rubio C, Rafael G-L, Baquero F, et al. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001. 45(3): 905-12.
14. Ogunshe AA, Omotoso MA, Adeyeye JA. In vitro antimicrobial characteristic of bacteriocin producing *Lactobacillus* strains from Nigerian indigenous fermented foods. *Afr J Biotech*. 2007. 6(4): 445-453.
15. Seatcovic, S.L., Novacovic, J.J., Zavisic, G.N., Radulovic, Z.C., Marija, G.J., dan Jankov, R.M. The partial characterization of the antibacterial peptide bacteriocin G2 produced by the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* G2. *JSCS*. 2011. 76(5): 699-7.
16. Georgalaki M, Berghe E, Kritikos D, Devreese B, Beeumen J, Kalantzopoulos, et al. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68(12):5891-903.