

Karakterisasi Bakteriosin pada Bakteri *Asam Laktat Lactobacillus Paracasei* dari *Virgin Coconut Oil*

¹Fauzan, ²Marganof, ³Yuliesi Purnawati, ^{4*}Suryani

^{1,2} Fakultas Kehutanan, Universitas Muhammadiyah Sumatera Barat, Jalan Pasir Kandang no 4, Koto Tengah Padang

^{3,4} Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sumatera Barat, Jalan Pasir Kandang no 4, Koto

Detail Artikel

Diterima : 29 Februari 2020

Direvisi : 1 April 2020

Diterbitkan : 25 April 2020

Kata Kunci

bacteriocin

lactic acid bacteria

VCO (*Virgin Coconut Oil*)

characterization

Penulis Korespondensi

Name : Suryani

Affiliation : Universitas

Muhammadiyah Sumatera Barat

Email : suryanimdiah@yahoo.com

ABSTRAK

*Virgin Coconut Oil (VCO), selama ini dikenal banyak sekali kegunaannya disebabkan kandungan asam lauratnya yang tinggi. Tetapi ternyata tidak hanya itu melainkan adanya bakteri asam laktat yang mengandung bakteriosin. Dimana bakteriosin adalah peptide yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur yang bersifat patogen, bahkan dapat membunuh virus. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi bakteriosin yang ada pada bakteri asam laktat *Lactobacillus paracasei* yang terdapat pada lapisan minyak VCO. Adapun penelitian ini dimulai dengan mengisolasi bakteriosin menggunakan media MRSB (Merck), pemurnian bakteriosinnya dengan purifikasi parsial menggunakan metoda pengendapan Ammonium Sulfat. Karakterisasi dilakukan 4 macam, yaitu Kemampuan tumbuhnya BAL pada medium dilakukan dengan memvariasikan pH tertentu; Kemampuan bakteriosin dihasilkan pada medium dengan variasi pH tertentu, kemudian menganalisa antimikrobanya; Ketahanan bakteriosin tersebut pada pemanasan dengan variasi temperatur tertentu; Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE. Hasil purifikasi parsial yang paling bagus adalah pada pengendapan dengan 40% dan 60% ammonium sulfat. Untuk kemampuan tumbuh BAL, ternyata mampu tumbuh pada pH 2-9, Kemampuan aktivitas mikroba bakteriosin pada pH 2-6 untuk *E Coli*, pH 2-9 untuk *B Sbtillis* dan pH 2-10 untuk bakteri uji *Listeria monocytogenes* dan *S aureus*. Bakteriosin ini tahan sampai pemanasan 121 0C. Sehingga dapat disimpulkan bakteriosin ini bisa hidup pada manusia.*

ABSTRACT

*Virgin Coconut Oil (VCO), so far known for its many uses due to its high lauric acid content. But apparently not only that but the presence of lactic acid bacteria that contain bacteriocin. Where bacteriocin is a peptide that has the ability to inhibit the growth of bacteria and fungi that are pathogenic, can even kill the virus. The purpose of this study was to characterize the bacteriocin present in the *Lactobacillus paracasei* lactic acid bacteria found in the VCO oil layer. Characterization was carried out in 4 types, namely the ability to grow LAB on the medium carried out by varying a certain pH; The ability of bacteriocin is produced in a medium with a certain pH variation, then analyzes the antimicrobials; The resistance of the bacteriocin to heating with certain temperature variations; Determination of Molecular Weight with SDS-PAGE. The best partial purification results are precipitation with 40% and 60% ammonium sulfate. For the ability to grow LAB, it was able to grow*

at pH 2-9, the ability of bacteriocin microbial activity at pH 2-6 for *E. coli*, pH 2-9 for *B. subtilis* and pH 2-10 for the test bacteria *Listeria monocytogenes* and *S. aureus*. This bacteriocin is resistant to 121 °C heating. So it can be concluded that this bacteriocin can live in humans.

PENDAHULUAN

Virgin Coconut Oil (VCO) adalah minyak kelapa murni, yang disebut juga dengan minyak perawan, karena pembuatannya tanpa pemanasan, karena itu ikatan rantai karbon dari asam-asam lemak yang dikandungnya tidak terputus, dan menghasilkan asam lemak rantai sedang, yang dinamakan dengan Medium Chain Fatty Acid (MCFA), disebut juga dengan Medium Chain Triglyceride (MCT) (HANDAYANI, 2009). VCO mempunyai banyak kegunaan diantaranya sebagai suplemen yang dapat membantu untuk mengurangi akibat dari penyakit osteoporosis (Hayatullina *et al.*, 2012), karena VCO mampu melakukan oksidasi lipid pada tulang, dilakukan penelitian dengan menggunakan tikus sebagai hewan percobaannya (Abujazia *et al.*, 2012). VCO dapat berfungsi sebagai antibakteri atau antimikroba, karena adanya asam laurat yang jumlahnya hampir 50% bahkan ada yang sampai 54,08%, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti yang dilaporkan oleh (Manohar *et al.*, 2013), (Suryani *et al.*, 2020), (Suryani *et al.*, 2018), (Suryani *et al.*, 2014), (Suryani, Dharma A, Manjang Y, Arief S, 2016), (Widianingrum, Noviandi and Salasia, 2019), (Suryani, 2016), (Suryani *et al.*, 2017).

Sementara itu (Rahmadi *et al.*, 2013), melaporkan bahwa sifat antibakteri VCO disebabkan oleh adanya bakteriosin hidrofobik, dengan menggunakan sampel bakteri ujinya adalah *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*, yang menghasilkan aktivitas penghambatan antimikroba yang terbaik adalah oleh *E. coli*. Proses pembuatan VCO nya melalui fermentasi dengan menambahkan bakteri *Lactobacillus plantarum* dari air kelapa dan *Lactobacillus casei* dari yoghurt.

VCO juga dapat digunakan sebagai makanan atau suplemen yang dapat membantu mengurangi berat badan (Liau *et al.*, 2011). Bila VCO dikonsumsi dapat membantu mencegah tekanan darah tinggi (Nurul-Iman *et al.*, 2013).

Telah dilaporkan kegunaan VCO pada bidang nano teknologi di antaranya adalah untuk persiapan Nano Partikel (NP) dalam hal ini Perak NP atau Ag-NP pada proses LA (Laser Ablasi) di mana VCO digunakan sebagai pelarut. Penggunaan VCO disini karena VCO mengandung trigliserida dan mempunyai karboksilat polar (Zamiri *et al.*, 2011), Banyaknya kegunaan VCO karena VCO mengandung asam laurat yang tinggi (Suryani *et al.*, 2020). Disamping itu juga karena VCO dibuat dengan cara fermentasi sehingga, mengandung bakteri asam laktat. Sementara itu Bakteri asam laktat mempunyai bakteriosin yang dapat membunuh bakteri jahat (Brosnan *et al.*, 2012).

Bakteriosin adalah peptida, atau senyawa protein yang kompleks dihasilkan oleh bakteri dan disintesa diribosom, mempunyai aktifitas antibakteri terutama terhadap bakteri patogen. Bakteriosin dapat berasal dari bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif (Brosnan *et al.*, 2012). Bakteriosin biasanya dianggap sebagai antibiotik spektrum sempit. Pada umumnya bakteriosin dihasilkan oleh bakteri asam laktat (Udhayashree *et al.*, 2012).

Bakteriosin pertamakali ditemukan oleh A. Gratia pada tahun 1925 di mana dia menemukan colicine, bakteriosin yang dapat membunuh *E. coli* sebagai alternatif

pengembangan bakteriofaga pada pencarian cara lain untuk membunuh bakteri patalogen (Mahrous, 2011). Dengan berjalannya waktu dan lebih berkembangnya penelitian tentang bakteriosin, maka makin banyak pula bakteriosin yang ditemukan, sehingga perlu bakteriosin itu dikelompokkan–kelompokkan (Lee and Kim, 2011).

Dengan banyaknya bakteriosin yang ditemukan maka perlu diatur penamaannya seperti nama bakteriosin disesuaikan dengan bakteri penghasilnya contoh Lactococcin A, Lactococcin Gal, Lactococcin Gb, Lactococcin B, Lactococcin 972, dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* (R. Majidzadeh Heravi, 2011). Produksi bakteriosin telah dikaukan oleh (Gao et al., 2012). Dari bakteri *Enterococcus avium* dihasilkan bakteriosin yang diberi nama Avicin A (Birri et al., 2010). Di bagian lain Tulini (Tulini, Gomes and Martinis, 2011) telah mengkarakterisasi dan memurnikan bakteriosin Enterococin yang dihasilkan oleh *Enterococcus faecium*, dan berat molekulnya telah ditentukan, yaitu 3,5 kDa– 6,5 kDa. Bakteriosin yang lain seperti Carnobactericin dihasilkan oleh bakteri *Carnobacterium*, bakteriosin Aurecin dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*, Bacillocin adalah bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus licheniformis*, bakteriosin Acidolin, Acidophilin, dan bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Lactobacillus acidophilus* diberi nama Lactacin (Elamathy and Kanchana, 2013), telah mengkarakterisasi bakteriosin ini, dan hasilnya bakteriosin ini ternyata dapat menghambat pertumbuhan bakteri patalogen *Staphylococcus sp.* Sebelumnya Todorov (2011), telah pula mempelajari aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri patalogen *Listeria monocytogenes* oleh bakteriosin yang dihasilkan bakteri *Lactobacillus acidophilus* ini. *Lactocin* dan *Helveticin* adalah bakteriosin dari bakteri *Lactobacillus helveticus*, serta *Plantaricin* adalah bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum*. *Plantaricin* yang telah dipelajari di antaranya *Plantaricin* yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG 61730) juga telah dipelajari sekuensing genomnya (Abdel-Rahman et al., 2011), (Sankar et al., 2012). Sankar (2012) juga mempelajari bakteriosin yang berasal dari bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diisolasi dari susu sapi, dan bakteriosin ini menunjukkan aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri patalogen *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* dan *Enterococcus fecalis*, dan telah dianalisa dengan SDS-PAGE ukuran molekulnya yaitu 9,5 kDa. Tetapi bakteriosin dari bakteri asam laktat yang ada pada VCO belum dipelajari, sehingga penelitian ini bertujuan mempelajari bakteriosin yang ada pada VCO dan mempelajari karakterisasinya.

METODE PENELITIAN

Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium LLDIKTI Wilayah X Padang.

Alat dan Bahan

Bahan:

Untuk Isolasi bakteriosin, bahan yang digunakan adalah media MRSB (Merck), *Lactobacillus paracasei*, Ammonium Sulfat (NH₄)₂SO₄ (teknis), Buffer Posphat pa, DEAE ssellulosa, butanol (pa), stacking gel SDS dan marker.

Untuk pemurnian/ purifikasi parsial bakteriosin, zat yang digunakan Ammonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (teknis), buffer Posphat, DEAE sselulosa, butanol, stacking gel SDS dan marker, isolat *Lactobacillus paracasei*, Ammonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, buffer Kalium Posphat (teknis), DEAE sselulosa, butanol, stacking gel SDS serta marker.

Untuk karakterisasi bakteriosin bahan yang digunakan adalah media MRSB (Merck), untuk variasi pH digunakan HCl (pa), bis akrilamid 0,8 %, SDS, sampel buffer 5x Tris HCl ,SDS 2 gr. bromfenol blue dan gliserin Buffer elektroda glisin dan tris APS dan PBS.

Alat:

Untuk Isolasi bakteriosin Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung, shaker dan alat gelas lain yang umumnya dipakai.

Untuk pemurnian/ purifikasi parsial bakteriosin, digunakan alat-alat gelas yang biasa dipakai seperti pipet tetes, pipet takar, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sentrifuse, penangas air untuk memngatur temperatur. serta tabung dialysis.

Untuk karakterisasi bakteriosin Alat-alat gelas yang biasa dipakai seperti pipet tetes, pipet takar, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sentrifuse, penangas air untuk memngatur temperatur. Dan untuk elektroforesis dipakai SDS-PAGE.

Prosedur

Isolasi bakteriosin

Isolasi bakteriosin dikatakan juga sebagai produksi bakteriosin, dimulai dengan dengan penanaman kultur isolat BAL (*Lactobacillus paracasei*), dengan mengambil 10% inokulum dari volume media yang digunakan (1000 ml) . Dimana diasumsikan jumlah selnya 10^8 CFU /ml. Kemudian diinkubasi 48 jam dengan di shaker karena memerlukan aerasi kecepatan shaker 150 rpm, pada 37 °C. Kultur isolat (*Lactobacillus paracasei*) ini disentrifuse pada 10.000 rpm selama 15 menit, akan terdapat supernatan dan endapan dimana supernatan mengandung bakteriosin, karena bakteriosin ini adalah metabolit sekunder ekstra selluler dan endapannya adalah sel yang tidak diperlukan. Pada isolasi bakteriosin ini inkubasi selama 48 jam, sebab bakteriosin akan diproduksi setelah fase log sampai fase menuju kematian sel. Supernatan nya diambil dan ini adalah crude bakteriosin (Khan, 2013), (Sankar *et al.*, 2012), (Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2010).

Pemurnian/ purifikasi parsial bakteriosin

Setelah didapatkan supernatan hasil isolasi bakteriosin, 10 ml supernatant itu ditambah dengan Ammonium Sulfat yang divariasikan konsentrasinya, yaitu 20 %, 40%, 60 %, dan 80 %. Kemudian dihomogenkan sampai tidak dapat larut lagi, lalu disimpan pada temperatur 4°C, selama 24 jam. Campuran ini disentrifuse 6000 rpm 10 menit, untuk mengambil endapannya dan endapan ini dicuci dengan meresuspensinya menggunakan buffer Kalium Posfat. Terakhir dilakukan dialisis dengan coloum DEAE cellulose dan untuk menentukan besar molekulnya menggunakan SDS-PAGE. (Sankar *et al.*, 2012), (Todorov *et al.*, 2011), (Sankar *et al.*, 2012), (Udhayashree *et al.*, 2012).

Karakterisasi Bakteriosin

Karakterisasi bakteriosin yang dilakukan ada 4 macam yaitu:

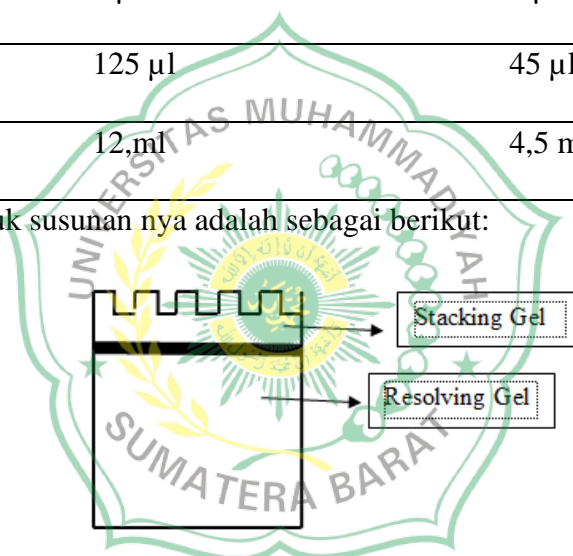
- 1) Kemampuan tumbuhnya BAL pada medium dilakukan dengan memvariasikan pH tertentu. dimana pH media diatur dengan menambahkan HCl. Variasi pH dibuat dari pH =2 sampai pH = 12. Isolat BAL dalam hal ini *Lactobacillus paracasei* di tumbuhkan pada variasi pH tersebut, kemudian diinkubasi semalam pada 37 °C. Diamati pertumbuhannya dengan melihat kekeruhan dari inokulum.
- 2) Kemampuan bakteriosin dihasilkan pada medium dengan variasi pH tertentu. Isolat yang tumbuh di sentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatnya diambil dan diuji aktivitas antimikrobanya, dengan menginkubasi semalam, dan diamati zone bening yang dihasilkan.
- 3) Ketahanan bakteriosin tersebut pada pemanasan dengan variasi temperatur tertentu. Untuk karakterisasi ketahanan bakteriosin, adalah dengan ditumbuhkannya isolat *Lactobacillus paracasei* pada media MRSB (Merck), semalam pada 37 °C. Isolat yang tumbuh disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, lalu supernatnya dipanaskan pada variasi temperatur -20°C, 4°C, 55°C, 70°C, 85°C, 100°C, 121°C 1 atm.
- 4) Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE. Membran dipotong sesuai ukuran kemudian direndam dalam akuades selama 30 menit untuk menghilangkan gliserolnya, lalu cuci dengan akuades. Kemudian tambahkan sodiumbikarbonat 10 mM ke dalam wadah, dan ditunggu sampai mendidih, diinkubasi selama 10 menit. Lalu cuci dengan akuades dan tambahkan 10 mM Na₂ EDTA tunggu sampai mendidih inkubasi 10 menit cuci dengan akuades dan simpan dalam alkohol 20% pada 4°C sebelum digunakan. Adapun prosedur untuk menggunakan membrane dialysis, adalah dengan mengambil sebanyak 800 ml, 20 mM buffer Posfat pada 4°C (buffer sampel) yang terdiri dari 320 ml buffer ditambah dengan akuades 480 ml dimasukkan ke dalam tabung dialisis. Kemudian sampel yang sudah dicuci lagi dengan akuades, masukkan dimasukkan kedalam tabung dialysis, dimana membran dialisisnya sudah disiapkan dalam alkohol 20% dan pada 4°C. Kalau terdapat udara dalam tabung, dikeluarkan udaranya terlebih dahulu, baru proses dialisis dilakukan selama 24 jam. Maka akan didapat sampel yang bisa ditentukan berat molekulnya. Sebelum dilakukan penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE dilakukan dulu uji kandungan proteinnya dengan cara mengukur absorban supernatan pada panjang gelombang 595 nm, dengan ukuran kuvet 5 µl.

Pembuatan gel SDS-PAGE

Sebelumnya perlu dibuat gel SDS-PAGE, dengan komposisi gel SDS sebagai berikut:

| Bahan | Resolving 10% | Stocking 5% |
|----------------|----------------|----------------|
| Akuades steril | 4,95 ml | 3,1 ml |
| Akrilamid 30% | 4,15 ml | 0,75 ml |
| Tris HCl | pH 8,8 3,15 ml | pH 6,8 5,65 µl |
| SDS 10 % | 125 µl | 45 µl |
| Temed 10% | 9 µl | 4 µl |
| APS | 125 µl | 45 µl |
| Jumlah | 12,ml | 4,5 ml |

Adapun bentuk susunan nya adalah sebagai berikut:



Dengan memasukkan 5 ml resolving ditambah dengan 200 µl butanol lalu ditunggu hingga beku kemudian bilas dengan akuades setelah itu dikeringkan dengan kertas saring dan dipasang sisir kemudian tambahkan 2 ml Stocking Gel tunggu hingga beku, lalu dimasukkan ke kotak elektroforesis kemudian masukkan 1,3 L buffer elektroda lalu di run dengan 100 V selama 15 menit. Terakhir dilakukan elektroforesis protein (bakteriosin) dengan SDS-PAGE dengan mengambil Sebanyak 20 sampel 4 buffer sampel (1: 5) yang di spindown lalu dipanaskan selama 3 menit, kemudian di spindown lagi lalu dimasukkan dalam kedalam gel SDS running 100 volt selama 4 jam. Gel direndam dalam larutan staining lalu diganti larutan staining dengan destaining sampai terlihat pita-pita protein. Disimpan dalam asetat 10 %. Untuk keperluan pemetretan, gel dikeringkan lalu ditekan kemudian discan. Akan dapat data tentang besar molekul bakteriosin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteriosin dari BAL

Pada isolasi bakteriosin, keberhasilan isolasi ditandai dengan adanya endapan yang terjadi dari, pada proses pengendapan dengan menggunakan ammonium sulfat seperti yang dapat dilihat pada 1.Gambar berikut. Hasil pengendapan dengan Ammunium sulfat.



Gambar 1 , Hasil pengendapan dengan Ammonium Sulfat

Gambar 1.memperlihatkan endapan yang dihasilkan pada pengendapan dengan NH_4 (SO_4)Setelah dilakukan pengendapan, endapan dicuci dengan buffer fosfat lalu dilakukan uji aktivitas antibakterinya, di mana hasilnya dapat dilihat pada tabel 1. Berikut

Pemurnian/ purifikasi parsial bakteriosin

Tabel 1. Hasil pemurnian bakteriosin dengan pengendapan (NH_4) $_2$ SO_4 pada variasi konsentrasi

| No. | Kode isolat | % (NH_4) $_2$ SO_4 | Diameter hambat mikroba | | | | |
|-----|-------------|--|-------------------------|----------|---------|------------|----------|
| | | | E.coli | S.aureus | S.Thypi | B.subtilis | Listeria |
| 1 | M0 | 20 | - | - | - | - | - |
| | | 40 | 15 | 9 | 10 | 10 | 10 |
| | | 60 | 15 | 10 | 8 | 8 | 12 |
| | | 80 | - | - | - | - | - |

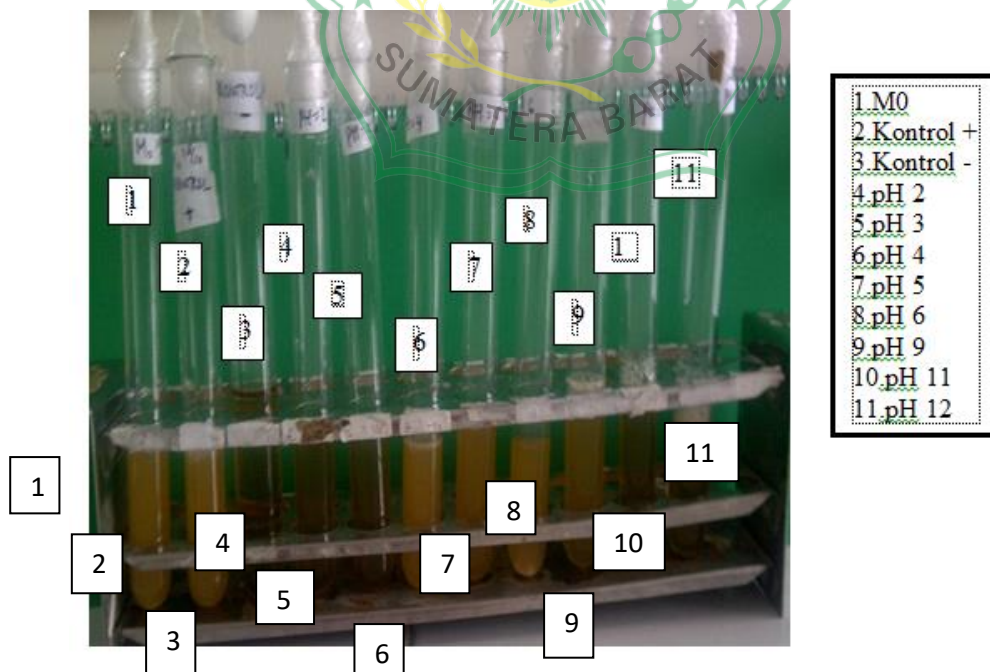
Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa untuk pengendapan dengan 40% dan 60% ammonium sulfat, hasil yang paling bagus, sehingga untuk melakukan pemurnian parsial informasi ini yang dijadikan acuan. Informasi ini dipakai untuk mengkarakterisasi bakteriosin dengan

mengukur berat molekul. Pada umumnya peneliti-peneliti yang lain juga memvariasikan ammonium sulfatnya dengan variasi 20 %, 40 %, 60 % dan 80%, seperti yang dilakukan oleh Pieterse, (Pieterse, Todorov and Dicks, 2008) yang mempelajari pemurnian parsial bakteriosin ST91KM yang dihasilkan oleh *Streptococcus gallotycus* subsp.*macedonicus* ST91KM dengan pengendapan ammonium sulfat juga dan dengan variasi ammonium sulfat juga 20%, 40%, 60%, dan 80%. Tidak berbeda jauh dengan, (Gautam and Sharma, 2009), yang mengisolasi bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* dari udang laut memvariasikan ammonium sulfatnya dengan variasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 % dan mendapat kan hasil yang baik pada pengendapan 50 %. Isolasi bakteriosin dan karakterisasi atau pemurnian parsialnya menggunakan pengendapan dengan ammonium sulfat dilakukan oleh (Khan, 2013) dan menggunakan 45 % ammonium sulfatnya. Cherif, (Cherif *et al.*, 2008) melakukan pula purifikasi parsial bakteriosin Entomocin HD110 yang diisolasinya dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110, yang menggunakan pengendapan dengan ammonium sulfat dengan konsentrasi 80%. Chemimi,(Chehimi *et al.*, 2007) yang juga melakukan purifikasi bakteriosin yang diisolasinya yaitu Thuricin S yang berasal dari *Bacillus thuringiensis* dengan menggunakan HPLC. Pemurnian bakteriosin dengan menggunakan Mass Spektrometri juga dilakukan, Birri, (Birri *et al.*, 2010). Begitupun (Chaney *et al.*, 2009) melakukan pemurnian bakteriosin dengan menggunakan MALDI-TOF (Proteomik analisa) pada waktu mempelajari pemurnian bakteriosin Mutacin 1140.

Karakterisasi Bakteriosin

Kemampuan tumbuhnya BAE pada medium dengan variasi pH tertentu

Hasil dari analisa kemampuan tumbuhnya BAL pada variasi pH tertentu dapat dilihat pada gambar 2 berikut:



Gambar 28. Hasil kemampuan tumbuh BAL terpilih pada berbagai variasi pH

Pada gambar 2 , (1) dapat dilihat bahwa isolat *Listeria monocytogenes* ditumbuhkan pada media MRSB dengan tidak diatur pH nya (dengan sendirinya pH adalah 4) , tumbuh baik dengan ditandai warna keruh yang terbentuk pada tabung reaksi (sel bakteri yang tumbuh); (2) adalah kontrol positif (sama dengan no 1); (3) adalah kontrol negatif, hanya media MRSB saja yang tidak diinokulasi, dan terlihat bahwa warna yang terjadi tidak keruh atau coklat bening yang menandakan bahwa tidak ada sel bakteri; dan seterusnya sampai no (8) menunjukkan isolat *Listeria monocytogenes* yang ditumbuhkan pada media pH 6 sampai dengan pH 11. Isolat yang ditanam pada media dengan pH 12, terlihat pada gambar tidak terjadi perubahan warna, yang menunjukkan bahwa isolat tidak dapat tumbuh pada pH 12.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 6 berikut:

Tabel 2. Uji karakteristik pengaruh pH media tumbuh

| No. | pH | Tumbuh/tidak | kuantitas |
|-----|----|--------------|-----------|
| 1. | 2 | √ | ++ |
| 2. | 3 | √ | ++ |
| 3. | 4 | √ | +++ |
| 4. | 5 | √ | +++ |
| 5. | 6 | √ | +++ |
| 6. | 9 | √ | +++ |
| 7. | 10 | - | - |
| 8. | 11 | - | - |
| 9. | 12 | - | - |

Pada tabel 2, ternyata BAL terpilih mampu tumbuh pada range pH yang sempit yaitu dari pH 2 sampai pH 9 . Bila dihubungkan dengan aplikasi pada lambung bakteriosin ini mampu hidup baik di lambung. Dibandingkan, dengan bakteriosin yang diisolasi oleh Khalil, 2009 hanya mampu tumbuh pada range pH 4.5- 5. Sementara Pieterse, 2008 mengkarakterisasi bakteriosin ST91 KM yang diisolasinya hanya mampu tumbuh pada pH 2. Disisi lain Soumya T.V, 2012 mengkarakterisasi kemampuan tumbuh BAL yang menghasilkan bakteriosin yang diisolasinya, mampu tumbuh pada range pH 4,5- 9 juga. Sharma, 2011 mengkarakterisasi pH medium tempat tumbuh BAL yang menghasilkan bakteriosin dari *Bacillus subtilis* R75 mampu tumbuh di range pH yang luas yaitu dari 3 – 11.

Kemampuan bakteriosin dihasilkan pada medium dengan variasi pH tertentu

Bila dianalisa kemampuan bakteriosin yang dihasilkan pada saat ditumbuhkan pada berbagai variasi pH, maka hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Hasil Uji antibakteri kemampuan bakteriosin dihasilkan pada pH tertentu (diamater zone hamhat /mm)

| pH | Diameter hambatan antimikroba (mm) | | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>B.subtilis</i> | <i>S.thypi</i> | <i>Listeria</i> | <i>S.aureus</i> |
| 2 | 15 | 13 | 18 | 15 | 23 |
| 3 | 11 | 11 | 14 | 11 | 11 |
| 4 | 15 | 19 | 13 | 12 | 12 |
| 5 | 13 | 15 | 15 | 18 | 20 |
| 6 | 14 | 23 | 24 | 12 | 15 |
| 9 | - | 11 | 12 | - | 9 |
| 10 | - | - | 11 | - | 10 |
| 11 | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - |

Kemampuan bakteriosin terhadap penghambatan dengan bakteri uji *Salmonella thypi* yang paling besar adalah pada bakteriosin yang ditanam pada media dengan pH 6 yaitu 2, yang diikuti dengan penanaman pada pH 2 yaitu 18 mm², kemudian, pH 5 yaitu 15 mm² lalu pH 3 yaitu 13mm², pH 9 yaitu 12mm² dan pH 10 yaitu 11 mm². Demikian juga dengan kemampuan penghambatan bakteriosin terhadap bakteri uji *S.aureus* yang ditanam pada media dengan berbagai variasi pH. Bila dilihat secara umum bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL terpilih mampu hidup pada range pH yang panjang yaitu dari pH 2 – pH 12. Sesuai juga dengan data yang dapat dilihat pada gambar 31. Berikut:

Pada Tabel 3, bakteriosin yang dihasilkan dari penanaman BAL pada pH media 2 dan pH 4 memberikan hasil uji anti mikroba terhadap penghambatan *E.coli* yang besar zone beningnya dibanding dengan variasi pH yang lain yaitu 15 mm², berarti pada pH 2 dan pH 4 kemampuan BAL memproduksi bakteriosin bagus dan mampu tumbuh pada pH 2 dan pH 4. Dibandingkan dengan kemampuan bakteriosin yang dihasilkan pada pH 6 adalah 14 mm² dan pH 5 adalah 13mm² serta pH 3 adalah 11mm², sementara pada pH 11 dan pH 12 adalah 10 mm². Begitu juga dengan penghambatan bakteri patogen *Bacillus subtilis* dengan penanaman BAL yang menghasilkan bakteriosin dengan media pada pH 6 yang paling bagus yaitu 23 mm² kemudian pada pH 4 19 mm², lalu pada pH 2 sebesar 13mm² berikutnya pada pH 3, 11 dan 12 adalah 11mm².

Hasil ini sesuai juga dengan yang dipelajari oleh Todorov, 2011 yang mempelajari karakterisasi bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* La-14 dimana kemampuan tumbuh BAL nya pada range pH dari 2–12. Soumya T.V, 2012 mengkarakterisasi bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* sp, dengan memvariasikan pH media tumbuhnya BAL terpilih yang menghasilkan bakteriosin ternyata mempunyai range pH 4,5 – 9.

Ketahanan bakteriosin tersebut pada pemanasan dengan variasi temperatur tertentu

Berikut adalah hasil analisa ketahanan bakteriosin dari BAL terpilih pada pemanasan dengan berbagai variasi suhu atau karakterisasi bakteriosin dengan Heat Treatment yang hasilnya seperti tabel 4

Tabel 4. Karakterisasi bakteriosin dengan pengaruh temperatur

| No. | T °C | Waktu (jam) | Diameter Hambat antimikroba (mm) | | | | |
|-----|------|-------------|----------------------------------|------------|---------|----------|----------|
| | | | E.Coli | B.subtilis | S.thypi | Listeria | S.Aureus |
| 1. | 4 | 15 | 17 | 12 | 15 | 18 | 14 |
| | | 30 | 17 | 12 | 15 | 18 | 14 |
| | | 45 | 20 | 20 | 16 | 22 | 18 |
| | | 60 | 14 | 15 | 16 | 17 | 15 |
| 2. | -20 | 15 | 17 | 17 | 20 | 16 | 20 |
| | | 30 | 16 | 16 | 22 | 18 | 16 |
| | | 45 | 14 | 14 | 13 | 16 | 17 |
| | | 60 | 12 | 12 | 12 | 13 | 12 |
| 3. | 55 | 15 | 13 | 16 | 12 | 15 | 17 |
| | | 30 | 18 | 17 | 14 | 13 | 20 |
| | | 45 | 15 | 15 | 14 | 20 | 20 |
| | | 60 | 14 | 19 | 14 | 14 | 12 |
| 4. | 70 | 15 | 12 | 10 | 15 | 13 | 11 |
| | | 30 | 12 | 12 | 14 | 19 | 10 |
| | | 45 | 14 | 10 | 12 | 15 | 8 |
| | | 60 | 16 | 10 | 13 | 20 | - |
| 5. | 85 | 15 | 15 | 8 | 13 | 16 | 10 |
| | | 30 | 14 | 9 | 14 | 15 | 11 |
| | | 45 | 13 | 20 | 16 | 18 | 12 |
| | | 60 | 12 | 15 | 10 | 15 | 13 |
| 6. | 100 | 15 | 12 | 14 | 14 | 13 | 11 |
| | | 30 | 14 | 12 | 11 | 19 | 10 |
| | | 45 | 12 | 12 | 10 | 15 | 8 |
| | | 60 | 18 | 11 | 13 | 20 | - |
| 7. | 121 | 15 | 16 | 19 | 20 | 21 | 21 |

Bila diperhatikan tabel dan gambar yang memuat informasi tentang kemampuan hambat isolat terpilih (M0) terhadap bakteri uji pada berbagai temperatur, menunjukkan bahwa bakteriosin dapat dihasilkan pada -20°C, 4°C, 45 °C, 60 °C sampai dengan pada keadaan 121°C dapat diproduksi dan menghasilkan aktifitas antibakterinya.

Penentuan Berat molekul dengan SDS-PAGE

Sebelum dilakukan penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE dilakukan dulu analisa penentuan kadar protein dari sampel yang berisi bakteriosin, sebagai data pendukung bahwa sampel mengandung protein yang diharapkan adalah bakteriosin. Hasil penentuan kadar protein

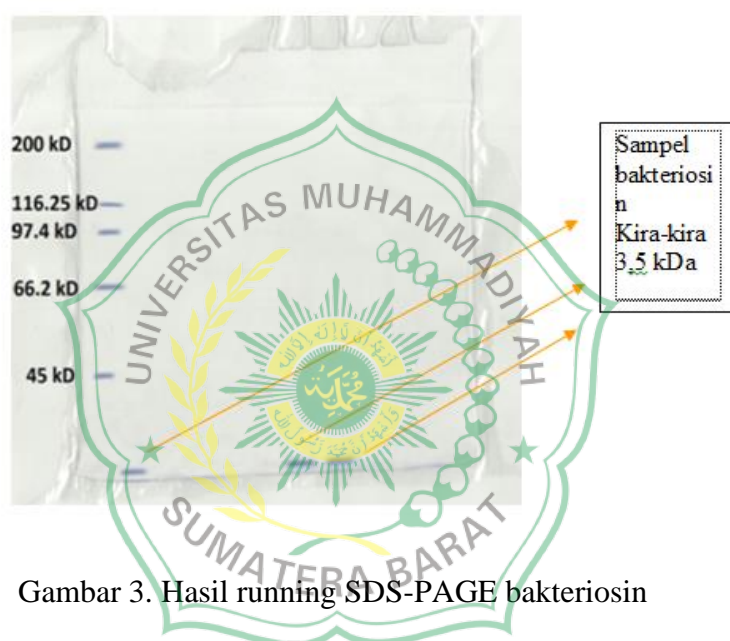
Tabel 5. Hasil penentuan kadar Protein sampel

| No. | Sampel | λ 595 | [protein]mg/ml | Keterangan |
|-----|--------|---------------|----------------|-------------------|
| 1. | M0 | 0,217 | 1,576 | Bakteriosin Crude |

Bakteriosin crude kadar proteinnya lebih sedikit dari bakteriosin yang diperlakukan dengan freez dry , demikian juga kadar protein bakteriosin yang diendapkan dengan ammonium sulfat kadar proteinnya lebih tinggi dari yang diperlakukan dengan freez dry.

Hasil Penentuan Berat molekul dengan SDS-PAGE

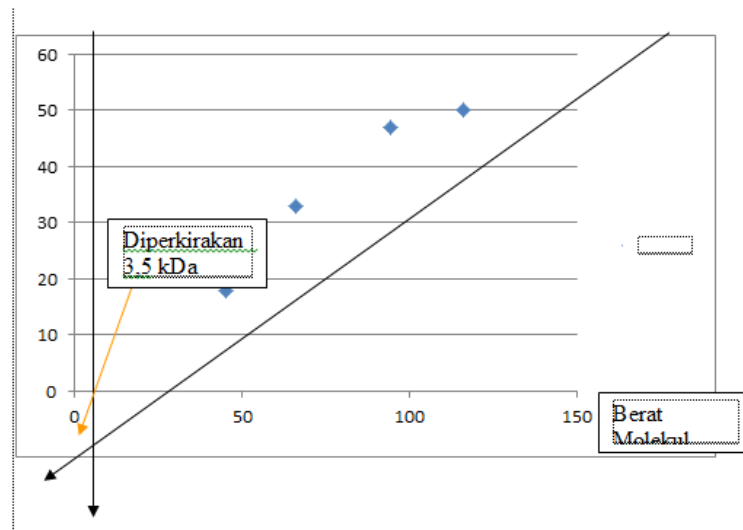
Penentuan berat molekul dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 3. Hasil running SDS-PAGE bakteriosin

Dari gambar 3 di atas, dapat dilihat ukuran berat molekul sampel yang dianalisa berada di bawah standar yang ada skalanya, maka untuk menentukan berat molekul sampel bisa dengan membuat kurva linear, dengan menghubungkan titik-titik yang di buat menjadi garis lurus sehingga bisa diekstrapolasi, akan di dapat berat molekul sampel adalah berkisar kira – kira 3,5 kDa. Data ekstrapolasi nya adalah sebagai berikut:

| X Berat mo | Y (migrasi bakteriosin) |
|------------|--------------------------|
| 200 | 58 |
| 116,25 | 50 |
| 94,4 | 47 |
| 66,2 | 33 |
| 45 | 18 |



SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat BAL *Listeria monocytogenes* dapat diisolasi bakteriosinnya dengan karakteristik dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam range pH yang panjang yaitu dari pH 2 – pH 9. Masih mempunyai aktifitas pada temperatur sampai 121 °C, dengan berat molekulnya sekitar 3,5 kD (SDS-PAGE).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Rahman, M. A. *et al.* (2011) 'Efficient homofermentative L-(+)-Lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), pp. 1892–1895. doi: 10.1128/AEM.02076-10.
- Abujazia, M. A. *et al.* (2012) 'The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomised rat', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(3), pp. 837–845. doi: 10.1155/2012/525079.
- Birri, D. J. *et al.* (2010) 'Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), pp. 483–492. doi: 10.1128/AEM.01597-09.
- Brosnan, B. *et al.* (2012) 'Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(10), pp. 2983–2995. doi: 10.1007/s00216-012-5955-1.
- Chaney, N. *et al.* (2009) 'Rapid method for extracting the antibiotic mutacin 1140 from complex fermentation medium yeast extract', *Canadian Journal of Microbiology*, 55(11), pp. 1261–1266. doi: 10.1139/W09-091.
- Chehimi, S. *et al.* (2007) 'Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*', *Canadian Journal of Microbiology*, 53(2), pp. 284–290. doi: 10.1139/W06-116.
- Cherif, A. *et al.* (2008) 'Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly

- identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110', *Microbiological Research*, 163(6), pp. 684–692. doi: 10.1016/j.micres.2006.10.005.
- Elamathy, S. and Kanchana, D. (2013) 'Characterization of heat stable and inhibitory activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*', *International Journal of ChemTech Research*, 5(3), pp. 1281–1283.
- Gao, Y. et al. (2012) 'Probiotic potential of L. sake C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage', *European Food Research and Technology*, 234(1), pp. 45–51. doi: 10.1007/s00217-011-1608-4.
- Gautam, N. and Sharma, N. (2009) 'Purification and characterization of bacteriocin produced by strain of *Lactobacillus brevis* MTCC 7539', *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46(4), pp. 337–341.
- HANDAYANI, R. (2009) 'Extraction of Coconut Oil (*Cocos nucifera* L.) through Fermentation System', *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 10(3), pp. 151–157. doi: 10.13057/biodiv/d100309.
- Hayatullina, Z. et al. (2012) 'Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. doi: 10.1155/2012/237236.
- Khan, H. (2013) 'Production, Characterization and Utilization of the Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* B9510', *Applied Chemistry and Biotechnology*, 162, pp. 1–186.
- Lee, H. and Kim, H. Y. (2011) 'Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), pp. 229–235. doi: 10.4014/jmb.1010.10017.
- Liau, K. M. et al. (2011) 'An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity', *ISRN Pharmacology*, 2011, pp. 1–7. doi: 10.5402/2011/949686.
- Mahrous, H. (2011) 'Probiotics Bacteria from Egyptian Infants cause Cholesterol Removal in Media and Survive in Yoghurt', *Food and Nutrition Sciences*, 2(2), pp. 150–155. doi: 10.4236/fns.2011.22021.
- Manohar, V. et al. (2013) 'In vitro and in vivo effects of two coconut oils in comparison to monolaurin on *Staphylococcus aureus*: Rodent studies', *Journal of Medicinal Food*, 16(6), pp. 499–503. doi: 10.1089/jmf.2012.0066.
- Nurul-Iman, B. S. et al. (2013) 'Virgin coconut oil prevents blood pressure elevation and improves endothelial functions in rats fed with repeatedly heated palm oil', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/629329.
- Pieterse, R., Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2008) 'Bacteriocin ST91KM, produced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* ST91KM, is a narrow-spectrum peptide active against bacteria associated with mastitis in dairy cattle', *Canadian Journal of Microbiology*, 54(7), pp. 525–531. doi: 10.1139/W08-040.

- R. Majidzadeh Heravi (2011) 'Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic', *African Journal of Microbiology Research*, 5(14), pp. 1858–1868. doi: 10.5897/ajmr11.416.
- Rahmadi, A. et al. (2013) 'Karakteristik Fisikokimia Dan Antibakteri Virgin Coconut Oil Hasil Fermentasi Bakteri Asam Laktat', *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 24(2), pp. 178–183. doi: 10.6066/jtip.2013.24.2.178.
- Sankar, N. R. et al. (2012) 'Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk', *International Journal of Microbiological Research*, 3(2), pp. 133–137. doi: 10.5829/idosi.ijmr.2012.3.2.62182.
- Sarmiento-Rubiano, L. A. et al. (2010) 'Characterization of a novel *Lactobacillus* species closely related to *Lactobacillus johnsonii* using a combination of molecular and comparative genomics methods', *BMC Genomics*, 11(1). doi: 10.1186/1471-2164-11-504.
- Suryani et al. (2014) 'Antimicrobial and antifungal activity of Lactic Acid Bacteria isolated from coconut milk fermentation', *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(6), pp. 1587–1595.
- Suryani, Dharma A, Manjang Y, Arief S, A. (2016) 'Isolation and Characterization of Bacteriocins Bacteria *Lactobacillus Plantarum* Strain NM178-5 from Fermentation Process with Contained on Coconut Milk', *Transylvanian Reviwer*, XXIV(6), pp. 614–628.
- Suryani, S. (2016) 'ISOLASI BAKTERI PATTOGEN PADA PASIEN PENDERITA INFEKSI TELINGA Chronic suppurative otitis media (OMSK)', *Jurnal Katalisator*, 1(2). doi: 10.22216/jk.v1i2.1005.
- Suryani, S. et al. (2017) 'IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT *Lactobacillus paracasei* YANG ADA PADA LAPISAN MINYAK VCO', *Jurnal Katalisator*, 2(2), p. 79. doi: 10.22216/jk.v2i2.2517.
- Suryani, S. et al. (2018) 'Isolation and identification of pathogenic bacteria secretion of chronic suppurative otitis media patients', *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(3), pp. 1139–1143. doi: 10.31788/RJC.2018.1131966.
- Suryani, S. et al. (2020) 'A Comparative Study of Virgin Coconut Oil , Coconut Oil and Palm Oil in Terms of Their Active Ingredients', *Processes*, 8(April), pp. 1–11.
- Todorov, S. D. et al. (2011) '1.la.Bacteriocin', pp. 357–370.
- Tulini, F. L., Gomes, B. C. and Martinis, E. C. P. de (2011) 'Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese', *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), pp. 155–159. doi: 10.1590/s0101-20612011000100022.
- Udhayashree, N. et al. (2012) 'Production of bacteriocin and their application in food products', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1 SUPPL.). doi:

10.1016/S2221-1691(12)60197-X.

Widianingrum, D. C., Noviandi, C. T. and Salasia, S. I. O. (2019) ‘Antibacterial and immunomodulator activities of virgin coconut oil (VCO) against *Staphylococcus aureus*’, *Heliyon*. Elsevier Ltd, 5(10), p. e02612. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02612.

Zamiri, R. *et al.* (2011) ‘Preparation of silver nanoparticles in virgin coconut oil using laser ablation’, *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), pp. 71–75. doi: 10.2147/IJN.S14005.

