

PENGUNAAN ANTIMIKROBA DARI ISOLAT *Lactobacillus* TERSELEKSI SEBAGAI BAHAN PENGAWET ALAMI UNTUK MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *VIBRIO SP.* DAN *Staphylococcus aureus* PADA FILLET IKAN KAKAP

Titin Yulinery, I. Y. Petria dan Novik Nurhidayat

Bidang Mikrobiologi, P2B LIPI
Jl. Raya Jakarta km 46, CSC. Cibinong
E-mail: tyulinery@yahoo.co.id

ABSTRACT

The fillet of kakap fish is easy to spoil, because of bacteria deterioration. Antimicrobes produced by *Lactobacillus* is one of save alternatives. The aim of this research was to know the potency of antimicrobes produced by the selected *Lactobacillus* to inhibit the growth of pathogenic bacteria that contaminated the kakap fillet such as *Vibrio sp.* and *S. aureus*. Selected *Lactobacillus* had been done by the variation of temperature treatments. Diffusion method was used to measure the wide of clear zone made by *Vibrio sp.* and *S. aureus*. In application, antimicrobe solution of selected microbes was used for soaking the kakap fillet, then the bacteria grown were counted on the beginning and the seventh day. The result shown that the wide of the inhibition area on *Vibrio sp.* was wider compare to the inhibition area made by *S. aureus* of kakap fillet. At treatment of temperature, antimicrobe solution remain to be active, only its resistivity depend on stability of antimicrobe yielded by selected *Lactobacillus*. For application used the antimicrobe produced by *Lactobacillus* (Mar 8) could inhibit the growth of *Vibrio sp.* and *S. aureus* on the 0 day and the seventh day, so that compound of antimicrobe can be used as natural preservative at fish product.

Key words: antimicrobes, fillet of kakap fish, *Lactobacillus*

PENGANTAR

Ikan kakap merupakan jenis ikan yang mempunyai nilai ekonomis dan banyak dikonsumsi masyarakat dalam bentuk segar. Berdasarkan kandungan protein dan lemaknya termasuk ikan tipe A dengan kategori protein tinggi (15–20%) dan kadar lemak rendah (5%) (Direktorat Jendral perikanan, 1990); serta 80,3% air; 0% karbohidrat; dan abu 1,1% (Afrianto dan Liviaty, 1989).

Penanganan ikan yang baik perlu dilakukan agar dapat sampai ke konsumen dalam keadaan segar. Salah satunya dengan membuatnya menjadi *fillet*, akan tetapi *fillet* ikan merupakan media yang sangat baik bagi pertumbuhan bakteri. Bakteri yang dominan dijumpai pada ikan adalah bakteri aerob atau aerob fakultatif antara lain *Vibrio sp.* yang berasal dari air laut dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari manusia pada waktu penanganan ikan tersebut.

Metode pendinginan dianggap cukup efektif dalam menjaga kesegaran dan mempertahankan mutu *fillet* ikan, namun pada beberapa proses penanganan ikan sering tidak dapat dilakukan metode pendinginan yang baik sehingga sering dilakukan cara lain, yaitu dengan penambahan bahan pengawet kimia buatan (*food additive*) seperti kalium sorbat dan fosfat untuk memperpanjang masa simpan. Namun, penggunaan bahan tersebut dapat membahayakan

kesehatan jika dosisnya tidak tepat. Di samping saat ini isu *back to nature* menyebabkan pengurangan penggunaan bahan pengawet kimia buatan sehingga diperlukan alternatif penanganan lain yang dapat menekan pertumbuhan mikroba yang lebih alami dan aman.

Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh *food grade microorganism* merupakan suatu alternatif untuk pengendalian mikroba, seperti Bakteri Asam Laktat (BAL). Metabolit yang dihasilkan oleh BAL dapat secara efektif mengontrol pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk (Holzapfel dkk., 1995). Genus BAL penghasil antimikroba yang telah banyak diteliti dan dipublikasikan, di antaranya adalah *Lactobacillus*. Bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen maupun pembusuk serta merusak makanan sehingga dapat memperpanjang waktu penyimpanan. Di samping menghasilkan metabolit berupa asam laktat, asam asetat, asam format, asam suksinat, etanol, dan karbondioksida (Fardiaz, 1992), juga senyawa lain yang bersifat antimikroba, yaitu bakteriosin, hidrogen peroksida (H_2O_2), karbondioksida, dan diasetil (Barefoot dan Nettles, 1993). Terbentuknya asam laktat oleh BAL dapat menyebabkan penurunan pH sehingga pertumbuhan bakteri gram + dan gram - yang tidak tahan pH rendah akan terhambat (Fardiaz, 1992; Jenie, 1996).

Efek bakterisidal dari hidrogen peroksida disebabkan oleh efek oksidasi yang kuat pada sel bakteri dan perusakan struktur molekul dasar dari sel protein (Lindgren dan Dobrogosz, 1990). Jenie dan Rini (1995) melaporkan *L. plantarum* dan *L. casei subsp Rhamnosus* mampu memproduksi H_2O_2 dalam jumlah yang tinggi sehingga cukup potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Sebesar 6 μ g hidrogen peroksida sudah dapat bersifat bakteristatik terhadap *S. aureus* dan \pm 35 μ g hidrogen peroksida/ml bersifat bakteriosidal terhadap bakteri lainnya, sedangkan diasetil dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk pada pangan dan daya kerjanya efektif terhadap bakteri gram negatif (Gilliland, 1986).

Bakteriosin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh sel yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri terutama bakteri gram positif (Hozapfel dkk., 1995), Selanjutnya Jimenez-Diaz dkk., (1993) mengatakan bahwa senyawa ini merupakan protein sehingga dapat terdegradasi dalam pencernaan manusia maupun hewan. Sejumlah bakteriosin dihasilkan oleh *Lactobacillus* berasal dari bahan pangan yang telah diisolasi dan diketahui memiliki efek antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen antara lain plantarisin UG1 dari *L. plantarum* yang diisolasi dari sosis kering dan plantarisin D dari strain *L. plantarum* BFE 905 yang diisolasi dari salad sayur dapat menghambat *Listeria monocytogenes* (Kusumawati, 2000). Di samping itu, acidosisin A yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* TK0201 (Kanatani dkk., 1995); bavarisin dari *L. bavaricus* M1401 yang diisolasi dari adonan asam (Larsen dkk, 1993); dan bavarisin yang dihasilkan *L. sake* MN (Kaiser dan Montville, 1996) juga dapat menghambat *L. monocytogenes*. Amylosin yang dihasilkan oleh *L. Amylovorus* US 121 mempunyai aktivitas hambatan terhadap *L. plantarum*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, dan *S. aureus* (Sudirman, 1996).

Staphylococcus aureus termasuk bakteri gram positif, tahan terhadap a_w (aktivitas air) rendah (minimum 0,86) serta garam dengan konsentrasi tinggi (Baird-Parker, 2000) dan tumbuh baik pada medium yang mengandung 7,5% NaCl (Fardiaz, 1992). Bakteri ini bersifat aerob fakultatif sehingga tahan hidup tanpa oksigen walaupun pertumbuhannya sangat lambat. Bakteri ini dapat dijumpai dalam berbagai makanan seperti daging dan produk daging, unggas, telur, ikan, susu, dan produk susu. Selain pada makanan, bakteri ini juga terdapat di udara, debu, air, lingkungan, hewan, dan manusia (Pelczar dan Chan, 1988).

Vibrio merupakan bakteri negatif gram yang bersifat anaerob fakultatif dan oksidasi positif. Beberapa spesies

Vibrio tidak dapat hidup pada medium tanpa NaCl, konsentrasi NaCl yang optimum untuk pertumbuhan *Vibrio* sebesar 3%. Sebagian besar spesies *Vibrio* hidup pada habitat perairan laut, sedangkan pada air tawar hanya hidup *V. cholera* dan *V. mimicus*. Beberapa *Vibrio* bersifat patogen pada manusia. Jenis *Vibrio* yang patogen antara lain adalah *V. cholera*, *V. vulnificus*.

Berdasarkan latar belakang serta permasalahan di atas, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba dari isolat *Lactobacillus* terseleksi dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio* sp. dan *S. aureus* pada *fillet* ikan kakap.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini menggunakan 8 isolat bakteri *Lactobacillus* yang diisolasi dari makanan fermentasi, yakni Mar 8 (dari markisa), Lac 3 (acar), Bl.Smd.Ai (belimbing), P 8 (pikel), P.Pdg.N3 (pado), C.Mnd.N4 (rumen sapi), L.Smd.A5 (lobak asin), Sg.Mnd.N5 (saguer). Bakteri uji yang digunakan adalah *Vibrio* sp. dan *Staphylococcus aureus*.

Seleksi Isolat *Lactobacillus* Dalam Menghambat Bakteri Uji

Penelitian ini dilakukan untuk memilih isolat *Lactobacillus* yang paling berpotensi menghasilkan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji, yaitu *Vibrio* sp. dan *S. aureus*.

Pembuatan Starter

Starter dibuat dari biakan *Lactobacillus* dan bakteri uji dengan menanamnya pada medium GYP (*Glucose Yeast Peptone*) cair. Diambil 1 ose bakteri *Lactobacillus* dan diinokulasikan dalam medium GYP cair sebanyak 5 ml (biakan *starter*), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30° C. Kemudian biakan dinokulasikan 4% ke dalam 10 ml medium GYP cair dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30° C. Demikian juga terhadap bakteri uji, yaitu diambil 1 ose bakteri *Vibrio* sp. dan *S. aureus* masing-masing ditanam ke dalam medium LB (*Luria Bertany*) sebanyak 10 ml dan diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam.

Pembuatan Supernatan

Setiap isolat *Lactobacillus* setelah ditumbuhkan dalam medium GYP dengan konsentrasi 10^8 sel/mL lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan. Supernatan disaring dengan menggunakan membran filter milipore ukuran 0,45 μ m. Pada tahap ini, supernatan yang diperoleh diberi

berbagai perlakuan suhu yang berbeda. Supernatan diberi perlakuan suhu selama 10 menit dengan cara disimpan pada suhu beku (0° C), suhu refrigerator (4° C), suhu kamar (30° C) dan dididihkan (100° C). Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui suhu terbaik bagi supernatan dalam menghambat bakteri uji. Ini berkaitan dengan suhu penyimpanan *fillet* ikan pada saat aplikasi. Sudah lama dikenal bahwa senyawa yang diekskresikan oleh bakteri tersebut di antaranya bakteriosin. Beberapa bakteriosin telah diteliti oleh beberapa kelompok penelitian seperti Bhunia *et al.*, (1988); Larsen *et al.*, (1993); Ohmomo *et al.*, (1999); dan Ohmomo *et al.*, (2000).

Uji Aktivitas Antimikroba

Metode yang digunakan adalah metode cakram. Biakan *Vibrio* sp. ditanam pada medium Merine, sedangkan *S. aureus* pada medium MSA (*Manitol Salt Phenol-red Agar*, Merck). Cakram diameter 6 mm direndam 5 menit di dalam supernatan yang telah diberi perlakuan suhu. Kemudian cakram diletakkan pada cawan yang telah ditanam dengan bakteri uji, lalu diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Sebagai kontrol adalah cakram yang direndam dalam medium GYP steril. Aktivitas hambatan supernatan terhadap pertumbuhan bakteri uji tampak sebagai zona bening di sekitar cakram. Pengamatan dilakukan dengan mengukur dan membandingkan zona bening dari setiap perlakuan tiap isolat. Kandidat terbaik adalah isolat dengan perlakuan supernatan yang memiliki zona hambat terluas. Isolat dan cara perlakuan yang terbaik akan digunakan dan diterapkan untuk aplikasi.

Aplikasi Antimikroba Isolat *Lactobacillus* Terseleksi Pada *Fillet* Ikan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan antimikroba dari *Lactobacillus* terseleksi sebagai pengawet alami pada *fillet* ikan kakap. Isolat *Lactobacillus* yang digunakan merupakan isolat dengan hasil terbaik pada tahap seleksi. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk merendam *fillet* ikan kakap.

Perlakuan Supernatan Pada *Fillet* Ikan

Potongan *fillet* ikan kakap sekitar 6 g direndam dalam supernatan dengan perbandingan 1:2 selama 10 menit sedangkan untuk kontrol tidak dilakukan perendaman, masing-masing dengan 3 ulangan. *Fillet* yang sudah direndam kemudian ditiriskan dan dimasukkan ke plastik, begitu pula dengan kontrol. Semua sampel disimpan pada suhu -2°–0° C. Pengamatan dilakukan pada hari ke-0 dan 7.

Pemeriksaan Kuantitatif Bakteri Uji

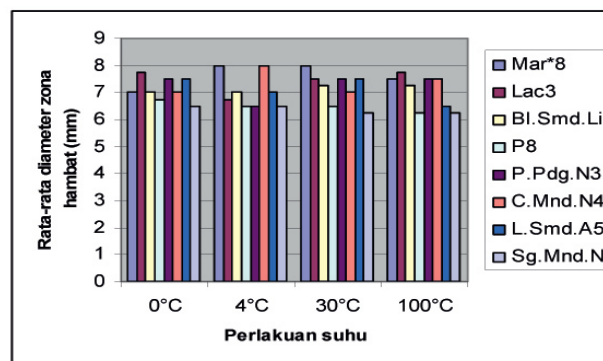
Pemeriksaan ini dilakukan secara TPC (*Total Plate Count*) untuk melihat jumlah total bakteri, jumlah bakteri *Vibrio* sp. dan *S. aureus* pada tiap sampel.

Fillet ikan sebanyak 1 g dihaluskan dan ditambahkan NaCl 0,85% lalu dilakukan pengenceran 10⁻¹–10⁻³ dan masing-masing pengenceran diambil 1 ml dimasukkan dalam cawan petri dan dilakukan teknik agar tuang dengan menggunakan medium NA (*Nutrien Agar*, Oxoid) untuk jumlah total bakteri, TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*, Difco) untuk *Vibrio* sp. dan MSA garam tinggi untuk *S. aureus*. Masing-masing dilakukan duplo kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Setelah inkubasi diamati koloni bakteri yang tumbuh pada setiap media. Pada media NA dihitung keseluruhan bakteri yang tumbuh. Media TCBS, diamati *Vibrio* sp. yang koloninya berwarna hijau/kuning sedangkan *S. aureus* pada medium MSA akan membentuk koloni putih kekuningan dengan zona kuning di sekitar koloni.

HASIL

Daya Hambat Isolat *Lactobacillus* terhadap Bakteri *Vibrio* sp. dan *S. aureus*

Kemampuan isolat *Lactobacillus* dalam menghambat bakteri uji dapat dilihat dari zona hambatan yang terbentuk (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Rata-rata diameter zona hambat antimikroba beberapa isolat *Lactobacillus* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan suhu

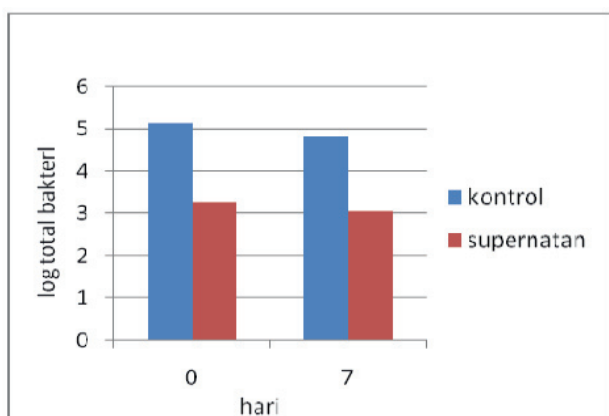
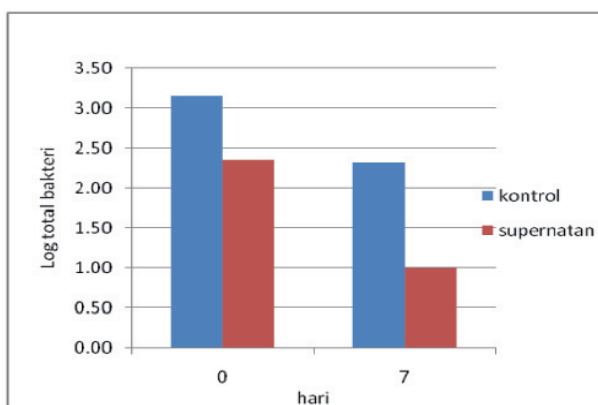
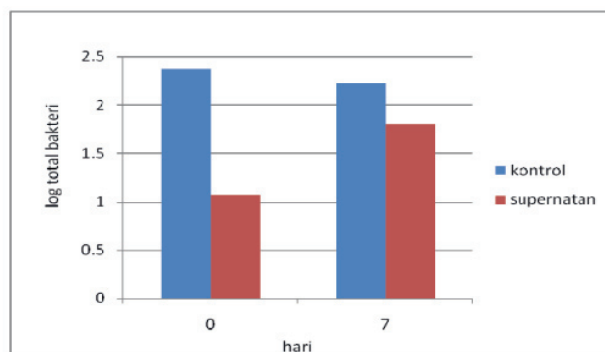
Aplikasi Antimikroba Isolat *Lactobacillus* Mar 8 pada *Fillet* Ikan Kakap

Berdasarkan hasil seleksi terpilih isolat *Lactobacillus* Mar 8 yang digunakan dalam aplikasi *fillet* ikan kakap.

Tabel 1. Jumlah rata-rata total bakteri, *Vibrio* sp. dan *S. aureus* setelah diberi perlakuan supernatan *Lactobacillus* Mar 8 pada fillet ikan hari ke-0 dan ke-7 (dalam satuan CFU/g)

Perlakuan	0 hari			7 hari		
	Total bakteri	<i>Vibrio</i> sp.	<i>S. aureus</i>	Total bakteri	<i>Vibrio</i> sp.	<i>S. aureus</i>
Supernatan	1920 ± 702,35	230 ± 26,46	11,67 ± 7,64	1153,33 ± 132,04	10 ± 5	63,33 ± 18,93
Kontrol	1,42.10 ⁵ ± 165.10 ³	1453,33 ± 529,37	235 ± 73,65	66500 ± 19918,58	210 ± 131,05	168,33 ± 96,74
Persentase penghambatan	98,65%	84,17%	95,03%	98,27%	95,23%	62,38%

Daya Hambat Antimikroba (supernatan) Mar 8 dan Kontrol terhadap Total Bakteri, *Vibrio* sp. dan *S. aureus* pada Hari ke-0 dan-7

**Gambar 3.** Histogram daya hambat antimikroba (supernatan) Mar 8 dan kontrol terhadap jumlah total bakteri pada hari ke-0 dan hari ke-7**Gambar 4.** Histogram daya hambat antimikroba (supernatan) Mar 8 dan kontrol terhadap jumlah *Vibrio* sp. pada hari ke-0 dan hari ke-7**Gambar 5.** Histogram daya hambat antimikroba (supernatan) Mar 8 dan kontrol terhadap jumlah *S. aureus* pada hari ke-0 dan hari ke-7

PEMBAHASAN

Daya Hambat Isolat *Lactobacillus* terhadap Bakteri *Vibrio* sp. dan *S. aureus*

Pada Gambar 1 dan 2 diketahui bahwa isolat *Lactobacillus* Mar8 mempunyai daya hambat yang tinggi terhadap *S. aureus* dengan zona hambatan 8 mm yang diinkubasi pada suhu kamar dan *refrigerator* (4° C) dan terhadap bakteri *Vibrio* sp. 13,25 mm pada suhu 4° C Sedangkan isolat Bl.Smd.Ai memiliki zona hambat yang tinggi pada suhu beku terhadap *Vibrio* sp. yakni 14 mm dan terhadap *S. aureus* dengan zona hambatan 7,25 mm yang diinkubasi pada suhu kamar dan dididih. Daya hambatan ini disebabkan oleh adanya senyawa yang bersifat antimikroba yang dihasilkan *Lactobacillus*. Senyawa antimikroba yang dihasilkan *Lactobacillus* adalah asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan bakteriosin (Barefoot dan Nettles, 1993).

Adanya perbedaan daya antimikroba dikarenakan perbedaan jenis *Lactobacillus* sehingga spesies yang berbeda akan menghasilkan penghambatan dan aktivitas yang beda karena perbedaan komponen metabolit yang dihasilkan.

Hasil sidik ragam senyawa antimikroba yang dihasilkan isolat *Lactobacillus* berpengaruh nyata ($P < 0,05$) dalam menghambat bakteri uji. Asam-asam organik yang dihasilkan seperti laktat, asetat, format menyebabkan penurunan pH sehingga suasana menjadi asam yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Rahayu dkk., 1992). Di samping itu, bakteriosin yang lebih berperan dalam menghambat bakteri uji karena bersifat stabil sehingga aktivitasnya tidak terganggu walaupun pada suhu tinggi maupun suhu rendah (Sudirman, 1996). Menurut Eckner (1992) mekanisme kerja bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji diawali dengan menempelnya molekul protein pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel bakteri kemudian masuk melalui dinding sel dan kontak dengan membran. Hal ini akan menyebabkan membran sitoplasma menjadi tidak stabil, akibatnya viabilitas sel rendah dan menyebabkan keluarnya material yang terdapat dalam inti sel bakteri sehingga sel menjadi mati. Lindgren dan Dobrogosz (1990) menyatakan hidrogen peroksida juga mempunyai efek bakterisidal yang menyebabkan oksidasi yang kuat pada sel bakteri dan merusak struktur molekul dasar dari protein sel.

Uji BNJ ($P < 0,05$) memperlihatkan perbedaan yang bermakna antara Mar 8 terhadap P8 dan Sg.Mnd.N5, begitu pula dengan Lac 3, Bl.Smd.Ai, P.Pdg.N3, C.Mnd.N4 dan L.Smd.A5. Hal ini berarti keenam isolat ini memiliki daya hambat yang lebih besar dibandingkan isolat P8 dan Sg.Mnd.N5, namun antara isolat Mar 8 tidak memberikan hasil yang berbeda secara statistik dengan kemampuan keenam isolat ini dalam menghambat bakteri *Vibrio sp.* dan *S. aureus* sama. Menurut Ray (2004) strain dan spesies yang berbeda dapat memproduksi bakteriosin yang sama. Bakteriosin bavarisin dihasilkan *L. bavaricus* M1401 (Larsen dkk., 1993) dan *L. sake* MN (Kaiser dan Montville, 1996).

Isolat P8 dan Sg.Mnd.N5 kurang berpotensi menghambat bakteri uji, hal ini dikarenakan konsentrasi *Lactobacillus* dari setiap isolat tersebut kurang banyak untuk menghasilkan konsentrasi senyawa antimikroba yang cukup untuk menghambat bakteri uji. Menurut Davidson dan Parish (1989) senyawa antimikroba harus memiliki konsentrasi yang cukup untuk bersifat bakterisidal dan setiap jenis bakteri butuh konsentrasi yang berbeda-beda untuk menghambat.

Dari delapan isolat tersebut, Mar 8 memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat bila dibandingkan dengan isolat lain. Semakin cepat pertumbuhan bakteri maka semakin banyak jumlah bakteri dan semakin banyak antimikroba yang dihasilkan sehingga dipilih Mar 8 sebagai isolat yang berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Respon *Vibrio sp.* dan *S. aureus* terhadap Antimikroba *Lactobacillus*

Pada sidik ragam terlihat bahwa respon antara kedua bakteri uji terhadap senyawa antimikroba yang dihasilkan isolat *Lactobacillus* berbeda nyata ($P < 0,05$). Hal ini berarti kedua bakteri uji mempunyai sensitivitas yang berbeda-beda terhadap senyawa antimikroba isolat *Lactobacillus*. Perbedaan sensitivitas ini disebabkan setiap jenis bakteri memiliki respon membran sel yang berbeda-beda (Nester, 2001).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa ada interaksi antara isolat *Lactobacillus* dengan bakteri uji ($P < 0,05$), seluruh isolat *Lactobacillus* lebih menghambat bakteri *Vibrio sp.* dibandingkan *S. aureus* seperti terlihat pada gambar 1 dan 2. Hal ini dikarenakan *Vibrio sp.* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki lapisan dinding peptidoglikan lebih tipis bila dibandingkan dengan *S. aureus*. Selain itu senyawa antimikroba yang dihasilkan *Lactobacillus* lebih efektif menghambat *Vibrio sp.*

Meskipun menurut Jack dkk. (1995), bakteriosin lebih menghambat bakteri yang berkerabat dekat dengan penghasil bakteriosin tersebut, namun Larsen dkk. (1993) menunjukkan bahwa bakteriosin dari *Lactobacillus plantarum* tidak menghambat *S. aureus*. Bakteriosin dari *L. acidophilus* menghambat bakteri gram negatif (Lindgren dan Dobrogosz, 1990). Gilliland (1986) menambahkan diasetil dapat menghambat paling efektif terhadap bakteri gram negatif. Fardiaz (1992) juga menambahkan bahwa kondisi pH rendah juga akan menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif.

Ketahanan Senyawa Antimikroba *Lactobacillus* terhadap Perlakuan Suhu

Pengaruh suhu terhadap antimikroba pada sidik ragam menunjukkan tidak bermakna ($P > 0,05$), artinya aktivitas antimikroba dari *Lactobacillus* masih dapat menghambat bakteri uji pada suhu beku, *refri*, kamar maupun dididh walaupun zona hambat yang dihasilkan kecil. Hal ini berarti aktivitas antimikroba dari *Lactobacillus* tetap aktif pada suhu tinggi maupun rendah. Beberapa bakteriosin

yang mempunyai ukuran molekul relatif kecil biasanya stabil terhadap panas (Jimenez-Diaz dkk, 1993). Aktivitas senyawa antimikroba yang dihasilkan *Lactobacillus* tetap stabil pada penyimpanan suhu -10°C selama 4 bulan. Sifat senyawa antimikroba tersebut cocok sebagai agen pengawet makanan karena beberapa proses pengolahan makanan meliputi tahap pemanasan dan juga pendinginan yang merupakan prosedur penyimpanan umum (Garver dan Muriana, 1994).

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa ada interaksi antara suhu dengan antimikroba isolat *Lactobacillus* ($P < 0,05$). Adanya variasi penghambatan antimikroba isolat *Lactobacillus* terhadap bakteri uji disebabkan perlakuan suhu (Gambar 1 dan 2). Perbedaan jenis *Lactobacillus* menyebabkan antimikroba yang dihasilkan berbeda sehingga aktivitas serta kestabilan antimikroba pun berbeda. Umumnya bakteriosin tahan terhadap perlakuan panas dengan kisaran suhu 100°C selama 10 menit. Demikian juga pada suhu rendah 4°C atau suhu refrigerasi dalam penyimpanan tidak mempengaruhi aktivitas bakteriosin, bahkan -20°C . Bakteriosin laktosin S stabil pada suhu 60°C selama 30 menit, sedangkan laktasin S dan laktasin B stabil pada 121°C selama 15 sampai 30 menit (de Vuyst dan Van Damme, 1994). Menurut Vaughan dkk. (1992), aktivitas helvitisin V-1829 menurun pada suhu 50°C selama 30 menit.

Pada suhu rendah asam dan hidrogen peroksida masih tetap aktif dan dapat merusak membran sel dari bakteri *Vibrio* sp. Pada suhu panas yang masih tetap aktif adalah bakteriosin, bakteriosin ini yang akan menghambat *S. aureus*. Menurut Jack dkk. (1995), bakteriosin bersifat bakteriosidal terhadap mikroorganisme yang berkerabat dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin tersebut.

Aplikasi Antimikroba Isolat *Lactobacillus* Mar 8 pada Fillet Ikan Kakap

Hasil penelitian aplikasi pada fillet ikan kakap menunjukkan bahwa supernatan isolat *Lactobacillus* Mar 8 dapat menghambat pertumbuhan total bakteri, *Vibrio* sp., dan *S. aureus* pada hari ke-0 dan ke-7 (tabel 1).

Dilihat dari sidik ragam antarperlakuan berpengaruh nyata dalam menghambat total bakteri ($P < 0,05$) (Tabel 5). *Fillet* ikan yang telah diberi supernatan dengan *fillet* ikan yang tidak diberi perlakuan (kontrol) terdapat perbedaan jumlah total bakteri. Supernatan dapat menghambat total bakteri sebesar 98,65% pada hari ke-0 dan 98,27% pada hari ke-7. Hal ini dapat terjadi karena supernatan yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* Mar 8 mengandung senyawa antimikroba yang mirip bakteriosin, bakteriosin merupakan (gliko)

protein. Aktivitas mirip bakteriosin pada *Lactobacillus* Mar 8 mungkin tergolong dalam kelompok bakteriosin. kemungkinan senyawa tersebut hanya diproduksi ketika *Lactobacillus* membutuhkannya, yakni ketika menerima *signal* dari mikroba targetnya.

Pengaruh hari terhadap perubahan jumlah total bakteri, pada sidik ragam menunjukkan tidak bermakna ($P > 0,05$). Artinya pada hari ke-0 dan hari ke-7 jumlah total bakteri bisa dikatakan tetap. Tidak adanya perubahan yang nyata dari jumlah total bakteri pada hari ke-0 dan ke-7, ditunjukkan pula pada Gambar 2. Hal ini membuktikan bahwa penyimpanan suhu rendah (hari ke-7) kurang efektif untuk menghambat pertumbuhan total bakteri pada *fillet* ikan.

Jumlah *Vibrio* sp. pada *fillet* ikan yang telah diberi supernatan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan *fillet* ikan yang tidak diberi perlakuan (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa supernatan *Lactobacillus* Mar 8 mampu menghambat *Vibrio* sp.

Pada *fillet* yang diberi supernatan menunjukkan hasil yang bermakna ($P < 0,05$) dalam menghambat *Vibrio* sp. dibandingkan dengan kontrol baik pada hari ke-0 maupun hari ke-7 (Gambar 3). Supernatan dapat menghambat *Vibrio* sp. sebesar 84,17% pada hari ke-0 dan 95,23% pada hari ke-7 (Tabel 1).

Selama penyimpanan supernatan *Lactobacillus* Mar 8 dapat menurunkan jumlah *Vibrio* sp. pada *fillet* ikan yaitu hari ke 0 sebesar $2,3 \cdot 10^2$ CFU/g menjadi $1 \cdot 10^1$ CFU/g pada hari ke 7. Begitu pula dengan kontrol dari $1,45 \cdot 10^3$ CFU/g pada hari ke-0 menjadi $2,1 \cdot 10^2$ CFU/g pada hari ke-7 (Tabel 1).

Penurunan ini dikarenakan adanya kerja sinergis antara aktivitas antimikroba dengan suhu penyimpanan (Kusumawati, 2000). Aktivitas senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh isolat *Lactobacillus* Mar 8 pada suhu rendah masih dapat menghambat (aktif) terhadap *Vibrio* sp. Di samping itu, adanya pengaruh suhu penyimpanan, yaitu penanganan dingin mampu menghambat *Vibrio* sp. Pada umumnya *Vibrio* sp. bersifat mesofilik sehingga sensitif terhadap suhu rendah. Menurut Liviawaty (1999) suhu rendah akan mengurangi aktivitas dan jumlah mikroba. Pengaruh pendinginan terhadap mikroba dalam bahan pangan tergantung pada sifat mikroba dan suhu penyimpanannya. Semakin besar perbedaan suhu penyimpanan dengan suhu pertumbuhan optimum mikroba maka kecepatan pertumbuhan menjadi lambat dan akhirnya mati. Ilyas (1983) membuktikan bahwa pertumbuhan bakteri pada ikan berkurang pada suhu -1°C hingga 5°C .

Jumlah *S. aureus* pada *fillet* ikan yang telah diberi supernatan menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$) dengan *fillet* ikan yang tidak diberi perlakuan (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa supernatan *Lactobacillus* Mar 8 dapat menghambat *S. aureus* pada *fillet* ikan. Antimikroba yang lebih berperan dalam menghambat *S. aureus* adalah bakteriosin. Karena bakteriosin menghambat bakteri yang berkerabat dekat dengan penghasil bakteriosin tersebut. Penelitian yang dilakukan Fujita and Okamoto (1999), juga mendukung bahwa kelompok bakteri asam laktat dari *Lactobacillus* dapat memproduksi substansi antimikroba dan bakteriosin yang bersifat bakterisidal terhadap mikroba patogen.

Peningkatan dan penurunan jumlah *S. aureus* pada hari ke-0 dan ke-7, terlihat jelas pada Gambar 4. Begitu pula interaksi antara perlakuan dengan hari menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$). Jumlah *S. aureus* mengalami peningkatan pada hari ke-7 dibandingkan dengan hari ke-0 yaitu dari $1,17.10^1$ CFU/g menjadi $6,33.10^1$ CFU/g (Tabel 1) dengan perlakuan supernatan pada *fillet* ikan. Peningkatan jumlah *S. aureus* tersebut disebabkan oleh bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* Mar 8 terdegradasi oleh senyawa antimikroba yaitu asam, di mana asam lebih berperan pada suhu rendah (suhu penyimpanan), sedangkan bakteriosin terdegradasi oleh adanya asam. Hal ini disebabkan bakteriosin merupakan senyawa protein (Jimenez-Diaz dkk., 1993). *S. aureus* lebih dihambat oleh bakteriosin, namun dengan adanya asam aktivitas bakteriosin tersebut hilang. Oleh karena itu, *S. aureus* masih tetap tumbuh pada penyimpanan pada hari ke-4. Sedangkan pada *fillet* yang tidak diberi perlakuan jumlah *S. aureus* menurun dari $2,35.10^1$ CFU/g menjadi $1,68.10^1$ CFU/g. Hal ini dikarenakan adanya persaingan antara *S. aureus* dengan bakteri lainnya. Jumlah populasi bakteri dalam komunitas banyak sehingga persaingan bakteri lain dengan *S. aureus* menyebabkan jumlah *S. aureus* berkurang (Gambar 5). Adanya kompetisi dengan mikroba lain di dalam makanan merupakan salah satu penyebab penting dalam menghilangkan kemampuan *S. aureus* untuk memproduksi toksin (Buckle dkk., 1987).

Senyawa antimikroba *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp. dan *S. aureus*. Senyawa antimikroba *Lactobacillus* lebih menghambat *Vibrio* sp. dibandingkan dengan *S. aureus*. Senyawa antimikroba dari isolat *Lactobacillus* terseleksi Mar 8 dapat menurunkan jumlah total bakteri, *Vibrio* sp., dan *S. aureus* pada *fillet* ikan. Senyawa antimikroba *Lactobacillus* Mar 8 berpotensi sebagai pengawet alami produk ikan. Diperlukan penelitian yang lebih lanjut terhadap karakterisasi senyawa bakteriosin, struktur dan kestabilan senyawa antimikroba

yang dihasilkan isolat *Lactobacillus* Mar 8 sehingga dapat digunakan sebagai pengawet alami dari produk ikan.

KEPUSTAKAAN

- Afrianto E dan Liviawaty C, 1989. **Pengawetan dan Pengolahan Ikan**. Kanisius Yogyakarta.
- Baird-Parker TC, 2000. *Staphylococcus aureus*. dalam: Lund BM, Baird-Parker TC dan Gould GW. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol II. Aspen Publisher Inc. Maryland.
- Barefoot SF dan Nettles CG, 1993. Antibiotics Revisited; Bacteriocins Produced by Dairy Stater Cultures. *J. dairy Sci*, 76: 2366–79.
- Bhunia AK, Johnson MC, dan Ray B, 1988. Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol*. 65: 261–8.
- Buckle KA, Edward RA, Fleet SH dan Wootton M, 1987. Ilmu Pangan. UI Prees. Jakarta.
- Davidson PM dan Parish MF, 1989. Methods for testing the efficiency of food antimicrobial. *Journal Food Technol*, 43: 148–55.
- de Vuyst L and Van Damme EJ, 1994. Antimicrobial Potencial of Lactic Acid Bacteria dalam: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics, and Applications*. de Vuyst L dan Van Damme EJ (Eds). Blackie Academic and Professional, London.
- Direktorat Jendral Perikanan, 1990. **Pedoman Pengenalan Sumber Perikanan Laut. Bagian I. Departemen Pertanian**. Jakarta.
- Eckner KF, 1992. Bacteriocins and food applications. *Dairy Food and Env Sanitation*. 12: 204–9.
- Fardiaz S, 1992. Mikrobiologi Pangan 1. PAU. Pangan dan Gizi IPB. Bogor. Jakarta.
- Fujita and Okomoto, 1999. Cloning and Identification of the Clustere Lactococcin A and M. Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. Lactis biovar diaacetylactis DRCi. *JARQ* 33: 133–7.
- Garver KI dan Muriana PM, 1994. Purification ang Partial Amino Acid Sequence of Curvaticin FS47, A Heat Stable Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *App and Env. Microbiol*. 60: 2191–5.
- Gilliland SE, 1986. Bacterial Stater Cultures for Foods. CRC Press, Boca Rotan.
- Holzapfel WH, Geisen R dan Schillinger U, 1995. **Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes**. *Int.J. Food Microbiol*. 24: 343–62.
- Ilyas S, 1983. **Refrigerasi Hasil Perikanan: Pendinginan**. L.PTP-BPPP. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Jack RW, Tagg JR dan Ray B, 1995. Bacteriocins of Gram-positif Bacteria. *Microbiol Rev*. 59: 171–200.
- Jenie BSL dan Rini SE, 1995. **Aktivitas Antimikroba dari Beberapa Spesies *Lactobacillus* terhadap Mikroba Patogen dan Perusak Makanan**. *Buletin Teknologi dan Industri Makanan*.

- Jenie BSL, 1996. **Peranan Bakteri Asam Laktat pada Pengawet Hayati Makanan.** *J. Ilmu dan Tek. Pangan.* 1: 60–73.
- Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez RM, Desmazeaud M, Ruiz-Barba JL dan Piard JC. 1993. Plantaricin S and T; Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from A Green Olive Fermentation. *App and Env Microbiol.* 59: 1416–24.
- Kaiser AL, and Montville TJ, 1996. Purification of The Bacteriocin Bavaricin MN and Characterization of Its Mode of Action Against *Listeria monocytogenes* Scott a Cells and Lipid Vehicles. *App and Env Microbiol.* 62: 4529–35.
- Kanatani K, Oshimura M dan Sono K, 1995. **Isolation and Characterization of Acidocin A and Cloning of The Bacteriocin Gene from *Lactobacillus acidophilus*.** *App and Env Microbiol.* 61: 1061–7.
- Kusumawati N, 2000. **Peranan Bakteri Asam Laktat.** *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi.* 1(1).
- Larsen GA, Vogencen FK dan Josephen J, 1993. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Doughs; Purification and Characterization of Bavaricin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *App Bacteriol.* 75: 113–22.
- Lindgren SE dan Dobrogosz WJ, 1990. Antagonistic activity of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microb. Rev.* 87: 149–64.
- Liviawaty E, 1999. **Mempelajari Efek Kondisi Post Mortem Ikan Nila Merah terhadap Perubahan Karakteristik *Fillet* Selama Penyimpanan Suhu Rendah.** Lembaga Penelitian. Universitas Padjadjaran.
- Nester EW, 2001. *Microbiology A Human Perspective.* 3rd Edition. McGraw Hill. New york. 2001.
- Ohmomo S, Kobayashi M, Yazima M, Suyanandana P, Budka P, dan Somchai P, 1999. Screening of thermophilic lactic acid bacteria producing bacteriocin in the tropics. *JARQ.* 33: 125–31.
- Ohmomo S, Murata S, Katayama N, Nitisinprasat S, Kobayashi M, Nakajima T, Yazima M, dan Nakanishi K, 2000. **Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157.** *J. Appl. Microbiol.* 88: 81–9.
- Pelczar MJ dan Chan ECS, 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi.** Terjemahan. UI Press. Jakarta.
- Rahayu WP, Ma'oen S, Fardiaz S dan Suliantari, 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan.* PAU. IPB. Bogor.
- Ray B, 2004. *Fundamental Food Mircobiology,* Third Edition CRC Press. New York. Washington DC.
- Sudirman I, 1996. **Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat Penghasil Bacteriosin Sebagai Starter Unggul dan Biopreservatif pada Makanan.** Laporan Penelitian, Hibah Bersaing IV/I Program Perguruan Tinggi. FKH IPB. Bogor.
- Vaughan EE, Daly C dan Fitzgerald GF, 1992. Identification and Characterization of Helveticin V-1829, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. App. Bacteriol.* 73: 299–308.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**