

BIOAKTIFITAS BAKTERIOSIN DARI DADIH SUMATERA BARAT

Abdi Dharna, Sumaryati Syukur dan Sri Utami Harsanti
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Dadih, susu kerbau yang difermentasi, dapat meningkatkan kesehatan manusia karena kandungan gizinya yang baik serta kemampuan aktifitas antagonisnya mikroba terhadap mikroba lain termasuk patogen yang masuk saluran pencernaan dari makanan. Aktifitas antagonis terhadap mikroba patogen disebabkan karena bakteriosin dari bakteri asam laktat (BAL) bersifat racun bagi mikroba lain, tetapi tidak bagi manusia. Aktifitas antagonis BAL dari dadih produk masyarakat Sumatera Barat terhadap 3 mikroba patogen telah dinilai. Dadih dari 5 kabupaten di Sumatera Barat, memperlihatkan nilai aktifitas antagonis BAL yang berbeda. BAL dari dadih yang mempunyai aktifitas antagonis tertinggi kemudian diisolasi dan diidentifikasi, dan bakteriosin yang dihasilkannya dikarakterisasi. Hasil identifikasi memperlihatkan persamaan antara bakteri ini dengan *Streptococcus* sp. Bakteri ini menghambat pertumbuhan mikroba uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Bakteriosin dari isolat ini masih aktif sampai 70% setelah pemanasan pada 100°C selama 15 menit, dan 100% aktif setelah diinkubasi dengan enzim tripsin.

Kata Kunci : dadih, bakteriosin, bakteri asam laktat

ABSTRACT

Dadih, a fermented buffalo milk, could improve the healthiness of man due to the nutrient content and microbial antagonistic activity including to pathogenic microbe in human digestion system. Antagonistic activity of dadih was due to the bacteriocine produced by lactic acid bacteria (LAB). Antagonistic activity of LAB of home industry's dadih production in Sumatera Barat toward 3 indicator bacteria have been assayed. LAB from dadih in 5 counties in Sumatera Barat shown the different antagonistic activity. The highest antagonistic activity was shown by LAB from dadih from Sawahlunto Sijunjung. The LAB from the dadih was then isolated and characterized, and the bacteriocine from this LAB was then partially purified and characterized. The bacteria was identified as *Streptococcus* sp. And inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. The bacteriocine activity was 70% recovered after heating at 100°C for 15 min, resistance to the proteolytic activity of trypsin.

Keyword : dadih, bacteriocine, lactic acid bacteria

PENDAHULUAN

Dadih merupakan produk olahan susu kerbau yang dibuat secara tradisional oleh masyarakat diberbagai wilayah termasuk di Sumatera Barat. Dadih sangat berpotensi sekali untuk diangkat menjadi produk andalan Sumatera Barat bila diolah dan dikemas dengan teknologi yang baik, karena pasar untuk itu masih terbuka luas. Disamping mempunyai nilai gizi yang tinggi dadih juga dapat menghalangi infeksi mikroba patogen karena bakteri asam laktat (BAL) didalam dadih dapat menghambat perkembangan mikroba patogen didalam usus. BAL juga dilaporkan dapat mencegah kanker jenis kanker tertentu¹.

BAL menghambat pertumbuhan mikroba lain dengan mengeluarkan senyawa yang bersifat sebagai bakteriostatik dan senyawa ini dikenal dengan nama bakteriosin. Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL yang sudah dikenal adalah dari senyawa polipeptida, seperti acidocin B², helveticin V-1829³, Jensenin G⁴, thermophilin 347⁵, lactacin F⁶.

Aktifitas antagonis dari masing-masing bakteriosin berbeda terhadap spesies mikroorganisme berbeda. Acidocin dari *Lactobacillus acidophilus* menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, tetapi tidak aktif terhadap spesies *Lactobacillus*

lainnya². Helveticin V-1829 dari *Lactobacillus helveticus* 1829 aktif terhadap *L. helveticus* 1844 dan *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 1489³⁾.

Bacteriocin yang dihasilkan oleh *Enterococcus faecium* 7C5 menghambat pertumbuhan *Listeria innocua* didalam susu⁷. Bacteriosin dari *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *Fediococcus pentosaceus* ATCC 43200, *P. pentosaceus* ATCC 43201, *Lactobacillus plantarum* BN, *L. plantarum* LB592, *L. plantarum* LB75, kecuali *Lactobacillus acidophilus* N2 aktif menghambat pertumbuhan dari *Clostridium botulinum*⁸. Entomocin dari *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9⁹ aktif terhadap bakteri Gram-positif termasuk *Listeria monocytogenes*, satu dari empat *Pseudomonas aeruginosa* patogen, dan beberapa jamur.

Bacteriosin tertentu adalah polipeptida yang tahan terhadap panas ataupun terhadap protease tertentu. Jensenin G, suatu bacteriosin yang dihasilkan oleh *Propionibacterium jensenii* P126 stabil terhadap panas⁴. Aktifitas bacteriosin dari entomocin⁹ bertahan lebih dari 72% setelah diinkubasi selama 20 menit pada 121°C⁹. Bacteriosin dari *Bacillus cereus* 8A stabil pada 80°C tetapi hilang aktifitasnya pada 87°C. Ia juga tahan terhadap enzim: proteolitik trypsin dan papain, tetapi sensitif terhadap proteinase K and pronase¹⁰.

Karena aktifitas bacteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan dari mikroba patogen, maka ia sangat berpotensi untuk digunakan sebagai antimikroba dalam industri makanan dan pertanian.

Potensi yang dikandung oleh dadih untuk pertumbuhan ekonomi dan perteliharaan kesehatan masyarakat adalah cukup besar, namun belum cukup usaha untuk pengembangan produk ini sehingga pemasarannya menjadi meluas dimasyarakat. Disamping itu potensi dari bacteriosin yang dihasilkan oleh BAL dadih untuk digunakan dalam industri makanan sebagai pengawet sangat besar, maka hal inilah yang menarik sehingga dilakukan penelitian ini.

METODA

Bahan

Dadiah dibeli dipasar lokal di 5 kabupaten di Sumatera Barat yaitu Kabupaten Tanah datar, 50-kota, Agam, Solok dan Sawah Lunto Sijunjung. Medium nutrient agar (NA), glukosa yeast pepton agar (GYPA), lactosa bromocresol purple (LBPCP) agar, TGE agar, TGE broth, biakan murni *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

Isolasi bakteri asam laktat dari dadih

Sampel dadih diencerkan sampai 10⁷ kali dengan aquadest, kemudian diinokulasikan dipermukaan GYPA, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diisolasi dan diinokulasikan di medium agar miring.

Seleksi Bakteri Penghasil Asam Tertinggi dari dadih

Sampel dadih diencerkan sampai 10⁷ kali dengan aquadest, kemudian diinokulasikan dipermukaan LBPCP, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dan membentuk zona kuning disekitarnya, yaitu bakteri penghasil asam yang tinggi, diisolasi dan diinokulasikan di medium agar miring.

Seleksi Bakteri Asam Laktat dengan Aktifitas Bacteriosin Tinggi

Dari uji pendahuluan ternyata bahwa ekstrak kasar dari dadih dapat menahan pertumbuhan mikroba *Staphylococcus aureus*. Dari itu mikroba ini digunakan sebagai mikroba penseleksi. Suspensi mikroba penseleksi diinokulasikan sebanyak 0,1 mL secara rata dipermukaan medium TGEA. Isolat BAL dikulturkan didalam medium TGE broth dan diinkubasi selama satu malam pada suhu kamar. Kemudian diatas biakan mikroba penguji diletakkan kertas cakram dengan diameter 5 mm yang sebelumnya sudah dicelupkan kedalam kultur isolat BAL, lalu diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Zona bening yang terbentuk disekeliling cakram, merupakan zona inhibisi pertumbuhan mikroba uji oleh bacteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL. Aktifitas antagonis dari isolat BAL terhadap bakteri penseleksi dihitung dengan rumus: selisih diameter zona hambatan dengan diameter cakram dibagi dengan diameter cakram¹¹.

Isolasi Bacteriosin dari BAL dadih

Inokulum BAL diinokulasikan pada 500 ml medium TGE broth, diinkubasi selama 16 jam tanpa agitasi pada 30 °C. Selanjutnya bacteriosin yang diekskresikan oleh isolat BAL kemedium dipisahkan dari sel dan banan padat dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Bacteriosin terdapat didalam supernatant. Kemudian supernatant dinetralkan dengan larutan NaOH. Protein terlarut didalam supernatant diendapkan dengan ammonium sulfat 80% jenuh, dan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 jam. Endapan dilarutkan kembali dengan 10 mM buffer Tris-HCl pH 8, kemudian didialisa dengan bufer yang sama untuk menarik kandungan ammonium sulfat. Selanjutnya fraksinasi

dilanjutkan dengan gel filtrasi, sephadex G 100. Hasil elusi ditampung dalam 5 ml volume fraksi. Setiap fraksi dimonitor dengan spektrofotometer pada 280 nm; dan dengan uji aktifitas antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*. Fraksi yang memberikan aktifitas antagonis dikumpulkan dan kemudian dipekatkan dengan metoda kering-beku, yang selanjutnya disebut dengan larutan bakteriosin.

Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Panas

Tabung reaksi berisi larutan bakteriosin dimasukkan kedalam air mendidih selama 15 menit, lalu dibiarkan mendingin sampai suhu kamar. Kemudian terhadap larutan ini dilakukan uji daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri uji menurut prosedur Wardani (1999)¹².

Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Enzim Tripsin

Kedalam tabung reaksi yang berisi larutan bakteriosin ditambahkan larutan 10 mg/ml enzim

tripsin didalam bufer fosfat pH 7. Kemudian campuran ini diinkubasi selama 1 jam pada 37 °C. Selanjutnya terhadap campuran ini dilakukan uji daya hambatnya terhadap pertumbuhan mikroba uji menurut prosedur Wardani (1999)¹².

HASIL DAN DISKUSI

Dadiah dari lima kabupaten di Sumatera Barat ditapis berdasarkan kemampuan mikroba untuk mengasilkan asam dan daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri uji. Dari hasil uji ternyata BAL dari dadiah Kabupaten Sawahlunto Sijunjung menghasilkan asam dan daya hambat pertumbuhan bakteri terbesar (Tabel 1), walaupun dari total koloni pergram dadiah bukanlah yang terbesar (data tidak diperlihatkan). Pada uji dari Isolat BAL dadiah dari Kabupaten Tanah Datar (D) terjadi kegagalan, sehingga tidak ada data yang dilaporkan.

Tabel. Zona Asam dan Aktifitas Antagonis BAL dari Dadiah Berbagai Daerah

No.	Kabupaten daerah asal dadiah isolat BAL	Zona bening didalam media indikator asam (mm)	Aktifitas antagonis terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>
1	Solok (A)	10,5	1,1
2	Limapuluh Kota (B)	9,5	0,9
3	Aqam (C)	7,0	0,4
4	Sawahlunto Sijunjung (E)	12,0	1,4

BAL dadiah yang memberikan aktifitas antagonis tertinggi yaitu dari dadiah yang berasal dari Kabupaten Sawahlunto Sijunjung diisolasi dengan metoda spread plate dengan pengenceran 10⁷ dalam media GYP. Dari hasil isolasi didapatkan 12 isolat yang ditandai dengan nama isolat E1 sampai E12. Setiap isolat diidentifikasi secara mikroskopis, pewarnaan Gram dan biokimia. Didapatkan bahwa semua isolat adalah anaerop, 11 dari 12 isolate berbentuk bulat, dan hanya satu yang bersifat Gram negative. Isolasi didominasi oleh mikroba dari genus *Streptococcus* (10 isolat). Sedangkan 2 isolat yang lain adalah dari genus *Klebsiela* (Gram negatif, 1 isolat) dan *Lactobacillus* (1 isolat).

Terhadap semua isolate BAL ini dilakukan uji aktifitas antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*. Isolat E4 (*Klebsiella sp*) dan isolate E2 (*Streptococcus sp2*) tidak memperlihatkan aktifitas antagonis, sedangkan isolate yang lainnya yaitu dari genus *Streptococcus sop* (9 isolat) dan *Lactobacillus sp* (1 isolat) memperlihatkan aktifitas antagonis

dengan nilai berkisar antara 1,1-2,2. Bakteriosin dari isolat E9 (*Streptococcus*) yang mempunyai nilai aktifitas antagonis terbesar (2,2) diteliti lebih lanjut.

Bakteriosin diisolasi dari filtrat kultur isolat E9 melalui fraksinasi pengendapan dengan ammonium sulfat 80% jenuh, kemudian fraksi yang mengendap difraksinasi lebih lanjut dengan gel filtrasi, setelah dilarutkan dan didialisa. Aktifitas antagonis terhadap mikroba uji didapatkan pada fraksi 14, 15, 16, 17 dan 18. Fraksi no 14 hanya menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, fraksi 15 dapat menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium*, sedangkan fraksi 16 dan 17 aktif menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli*. Data ini mengindikasikan kemungkinan adanya 3 jenis bakteriosin. Namun ini perlu pembuktian lebih lanjut.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh isolate BAL dari dadiah didapatkan masih aktif 70% setelah pemanasan pada 100 °C selama 15 menit. Aktifitas bakteriosin tidak berkurang sama

dilanjutkan dengan gel filtrasi, sephadex G 100. Hasil elusi ditampung dalam 5 ml volume fraksi. Setiap fraksi dimonitor dengan spektrofotometer pada 280 nm, dan dengan uji aktifitas antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*. Fraksi yang memberikan aktifitas antagonis dikumpulkan dan kemudian dipekatkan dengan metoda kering-beku, yang selanjutnya disebut dengan larutan bakteriosin.

Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Panas

Tabung reaksi berisi larutan bakteriosin dimasukkan kedalam air mendidih selama 15 menit, lalu dibiarkan mendingin sampai suhu kamar. Kemudian terhadap larutan ini dilakukan uji daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri uji menurut prosedur Wardani (1999)¹².

Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Enzim Tripsin

Kedalam tabung reaksi yang berisi larutan bakteriosin ditambahkan larutan 10 mg/ml enzim

tripsin didalam bufer fosfat pH 7. Kemudian campuran ini diinkubasi selama 1 jam pada 37 °C. Selanjutnya terhadap campuran ini dilakukan uji daya hambatnya terhadap pertumbuhan mikroba uji menurut prosedur Wardani (1999)¹².

HASIL DAN DISKUSI

Dadiah dari lima kabupaten di Sumatera Barat ditapis berdasarkan kemampuan mikroba untuk mengasilkan asam dan daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri uji. Dari hasil uji ternyata BAL dari dadiah Kabupaten Sawahlunto Sijunjung menghasilkan asam dan daya hambat pertumbuhan bakteri terbesar (Tabel 1), walaupun dari total koloni pergram dadiah bukanlah yang terbesar (data tidak diperlihatkan). Pada uji dari isolat BAL dadiah dari Kabupaten Tanah Datar (D) terjadi kegagalan, sehingga tidak ada data yang dilaporkan.

Tabel. Zona Asam dan Aktifitas Antagonis BAL dari Dadiah Berbagai Daerah

No.	Kabupaten daerah asal dadiah isolat BAL	Zona bening didalam media indikator asam (mm)	Aktifitas antagonis terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>
1	Solok (A)	10,5	1,1
2	Limapuluh Kota (B)	9,5	0,9
3	Agam (C)	7,0	0,4
4	Sawahlunto Sijunjung (E)	12,0	1,4

BAL dadiah yang memberikan aktifitas antagonis tertinggi yaitu dari dadiah yang berasal dari Kabupaten Sawahlunto Sijunjung diisolasi dengan metoda spread plate dengan pengenceran 10^7 dalam media GYP. Dari hasil isolasi didapatkan 12 isolat yang ditandai dengan nama isolat E1 sampai E12. Setiap isolat diidentifikasi secara mikroskopis, pewarnaan Gram dan biokimia. Didapatkan bahwa semua isolat adalah anaerop, 11 dari 12 isolate berbentuk bulat, dan hanya satu yang bersifat Gram negative. Isolat didominasi oleh mikroba dari genus *Streptococcus* (10 isolat). Sedangkan 2 isolat yang lain adalah dari genus *Klebsiella* (Gram negatif, 1 isolat) dan *Lactobacillus* (1 isolat).

Terhadap semua isolate BAL ini dilakukan uji aktifitas antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*. Isolat E4 (*Klebsiella* sp) dan isolate E2 (*Streptococcus* sp2) tidak memperlihatkan aktifitas antagonis, sedangkan isolate yang lainnya yaitu dari genus *Streptococcus* sop (9 isolat) dan *Lactobacillus* sp (1 isolat) memperlihatkan aktifitas antagonis

dengan nilai berkisar antara 1,1-2,2. Bakteriosin dari isolat E9 (*Streptococcus*) yang mempunyai nilai aktifitas antagonis terbesar (2,2) diteliti lebih lanjut.

Bakteriosin diisolasi dari filtrat kultur isolat E9 melalui fraksinasi pengendapan dengan ammonium sulfat 80% jenuh, kemudian fraksi yang mengendap difraksinasi lebih lanjut dengan gel filtrasi, setelah dilarutkan dan didialisa. Aktifitas antagonis terhadap mikroba uji didapatkan pada fraksi 14, 15, 16, 17 dan 18. Fraksi no 14 hanya menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, fraksi 15 dapat menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium*, sedangkan fraksi 16 dan 17 aktif menahan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli*. Data ini mengindikasikan kemungkinan adanya 3 jenis bakteriosin. Namun ini perlu pembuktian lebih lanjut.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh isolate BAL dari dadiah didapatkan masih aktif 70% setelah pemanasan pada 100 °C selama 15 menit. Aktifitas bakteriosin tidak berkurang sama

sekali setelah menginkubasinya dengan tripsin pada suhu 37 °C selama 1 jam. Data ini memperlihatkan bahwa bakteriosin ini cukup stabil terhadap panas dan enzim proteolitik tripsin, namun belum tentu dapat bertahan terhadap enzim proteolitik lainnya..

KESIMPULAN

Dadiah dari Sumatera Barat berpotensi sekali dikembangkan sebagai makanan sehat, dimana bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dadiah dapat menahan pertumbuhan beberapa bakteri patogen. Disamping itu bakteriosin ini juga berpotensi untuk digunakan sebagai zat bakteriostatik atau pengawet dalam industri makanan karena dia cukup tahan terhadap panas dan tahan terhadap enzim tripsin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Y. Aso., *Lactic Acid Bacteria and Cancer Prevention*, Shufunotamo Co., Ltd, Tokyo (1997).
2. R.J Leer, J.M.B.M.van-der.Vossen, M. van Giezen, J.M. van Noort, P.H. Pouwels, Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Reading*, 141:1629-1635. (1995)
3. E.E. Vaughan, C. Daly, G.F. Fitzgerald, Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J-Appl-Bacteriol*, 73:299-308. (1992)
4. D.A.Grinstead and S.F. Barefoot, Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *propionibacterium jensenii* P126, *Appl-Environ-Microbiol*, 58: 215-220 (1992).
5. F. Villani, O. Pepe, G. Mauriello, G. Salzano, G. Moschetti, S. Coppola, Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. *Int-j-food-microbiol*, 25: 179-190. (1995).
6. G.E. Allison, T.R. Klaenhammer, Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, latI, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl-environ-microbiol*, 62: 4450-4460. (1996)
7. G.Giraffa, D.Carminati, G.Torri-Tarelli, Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J-food-prof*, 58:621-623. (1995)
8. A. Okereke, T.J.Montville, Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Appl-Environ-Microbiol*, 57: 3423-3428. (1991)
9. A. Cherif1, S. Chehimi, F. Limem, B.M. Hansen, N.B. Hendriksen, D. Daffonchio and A. Boudabous, Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin B, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9, *J.App. Microbiol.*, 95: 990-1000 (2003).
10. D. Bizani and A. Brandelli, Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain B A. *J. App. Microbiol.*, 93: 512-519 (2002).
11. G.L. Enriquez, L.S. Saniel, R.R. Matias and J.L. Garibay *Laboratory Manual in General Microbiology*, University of the Philippines Press. (1995).
12. A.K. Wardani, Purifikasi dan karakterisasi bakteriosin dari bakteri asam laktat. Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta. (1999).