



AKTIVITAS ANTIBAKTERI FILTRAT HASIL PERTUMBUHAN

***Lactobacillus casei* TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*,
Salmonella typhi, DAN *Bacillus subtilis* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Dela Dwi Alawiyah
141810401032**

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2019



AKTIVITAS ANTIBAKTERI FILTRAT HASIL PERTUMBUHAN

***Lactobacillus casei* TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*,
Salmonella typhi, DAN *Bacillus subtilis* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh
Dela Dwi Alawiyah
NIM 141810401032

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa syukur dan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan karunia-Nya
2. Ibunda Rahayu Sutarti, Ayahanda Misto, Kakakku tercinta Sindu Widolaris, serta seluruh keluarga yang telah memberikan banyak pengorbanan, doa, motivasi serta kasih sayang kepada penulis sehingga bisa melangkah sejauh ini;
3. Bapak dan Ibu guru mulai TK Cut Nyak Dien Jember, SD Karangrejo II Jember, SMPN 2 Jember, SMAN 1 Jember, yang telah memberikan ilmu kepada penulis dari kecil hingga sekarang;
4. Almamater tercinta yaitu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember;
5. Bapak dan Ibu Dosen di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember yang telah membimbing dan mendukung dengan memberikan ilmu pengetahuan dan pengalaman kepada penulis;
6. Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri.”

(QS. Ar Ra’d: 11)*

“Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu Yang menciptakan, Dia menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmulah Yang Maha Pemurah, Yang mengajar (manusia) dengan perantaraan kalam. Dia mengajarkan kepada manusia apa yang tidak diketahuinya.”

(QS. Al ‘Alaq: 1-5)**

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur’an dan Terjemahannya Special for Woman*. Bogor: Syaamil Al-Qur’an.

**) Qardhawi Yusuf. 1998. *Al-Qur’an Berbicara tentang Akal dan Ilmu Pengetahuan*. Jakarta: Penerbit Gema Insani

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dela Dwi Alawiyah

NIM : 141810401032

menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei* Terhadap Bakteri *Escherihia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus substilis* Secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan yang saya tulis terbukti tidak benar.

Jember, 29 Januari 2018

Yang menyatakan,

Dela Dwi Alawiyah

NIM 141810401032

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FILTRAT HASIL PERTUMBUHAN
Lactobacillus casei TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*,
Salmonella typhi, DAN *Bacillus subtilis* SECARA *IN VITRO***

Oleh

Dela Dwi Alawiyah
141810401032

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Siswanto, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antibakteri Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei* Terhadap Bakteri *Escherihia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus substilis* Secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes
NIP 196008161989021001

Drs. Siswanto, M.Si
NIP 196012161993021001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S. Si., M.Si
NIP 19750913000032001

Dr. Sattya Arimurti, SP.,M.Si
NIP 197403311999032001

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Aktivitas Antibakteri Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei* Terhadap Bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus subtilis* Secara *In Vitro*; Dela Dwi Alawiyah, 141810401032; 2018; 32 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan istilah yang merujuk pada suatu kelompok bakteri penghasil asam laktat sebagai hasil utama fermentasi karbohidrat. BAL termasuk kelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, dan hidup dalam lingkungan aerobik maupun anaerobik. BAL diketahui memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri lain baik dari golongan Gram positif dan Gram negatif. Kemampuan penghambatan tersebut disebabkan oleh adanya beberapa senyawa antibakteri yang diproduksi BAL. Dilaporkan bahwa terdapat beberapa senyawa antibakteri yang berhasil diisolasi dari BAL, di antaranya yaitu asam laktat, asam asetat, bakteriosin, dan komponen penghambat lainnya.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap penentuan fase pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* dengan media GYP broth dilanjutkan oleh produksi filtrat *L. casei* pada media GYP broth. Uji aktivitas antibakteri filtrat *L. casei* dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* sebagai wakil bakteri komensal, *Salmonella typhi* sebagai wakil Gram negatif, dan *Bacillus subtilis* sebagai wakil Gram positif secara *in vitro*. Data diperoleh berdasarkan hasil pengukuran panjang diameter zona hambat yang terbentuk pada media kultur bakteri uji baik yang telah didifusikan dengan antibakteri ekstrak hasil pertumbuhan *L. casei* dan tanpa diberi ekstrak hasil pertumbuhan (kontrol positif dan negatif). Selanjutnya data dianalisis secara deskriptif dengan tabel dan gambar.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa filtrat *Lactobacillus casei* terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan bakteri uji antara lain, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*. Panjang diameter zona hambat dari terbesar ke terkecil adalah *B. subtilis* (5,33 mm),

S. typhi (4,77 mm), *E. coli* (3,5 mm). Bakteri uji yang mengalami penghambatan pertumbuhan tertinggi adalah *B. subtilis*.



PRAKATA

Puji syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei* Terhadap Bakteri *Escherihia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus substilis* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ketercapaian penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan-dukungan berbagai pihak terkait, oleh sebab itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen pembimbing utama sekaligus Dosen Pembimbing Akademik, dan Drs. Siswanto, M.Si., selaku Dosen pembimbing Anggota yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian ini;
2. Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S. Si., M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Dr. Sattya Arimurti, SP., M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi;
3. Ir. Endang Soesetyaningsih selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang telah banyak membantu penulis selama penelitian;
4. kedua orang tua, kakak, dan seluruh keluarga besar (khususnya sepupu saya Eries Diah Permatasari) yang telah memberikan banyak do'a, motivasi, materi, dan dukungan yang tiada henti kepada Penulis;
5. sahabat-sahabat penelitian saya Eka Yanuarti dan Siti Nurhalimah yang selalu membantu dan menyemangati selama proses penyelesaian skripsi saya;
6. sahabat-sahabat terdekat saya selama kuliah (Emitria Rahmawati, Eka Yanuarti Ningsih, Nindi Agusti Wulandari, Arina Amalia Putri, Sara Fati Indra, Siti Nurhalimah, Reiyang Vivi Indriyani, Rini Agustina, Ike Nurrohmah, Nur Endah Novia Lestari, Zunairoh Nidaan Khofiya) yang telah menjadi bagian hidup

penulis selama 4 tahun ini dan senantiasa memberikan doa, dukungan, serta semangat;

7. sahabat seperjuangan jurusan Biologi angkatan 2014 yang tidak dapat disebut satu persatu,
8. sahabat KKN 89 Gunungmalang, Sumberjambe (Eka Saputri, Dimas Eko Romadoni, Nafiys Hilmy, Nur Rosyida, Rika Crusita Oktavillia, Risnanda Ari Jupiter, Rommiyatun Zainiyah, Ulfatur Rohmah, Zainur Rosi) terima kasih untuk doa, motivasi, dan waktu kebersamaan yang kalian berikan;
9. semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam penyelesaian skripsi yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Jember, 29 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Bakteri Asam Laktat	4
2.2 Bakteri <i>Lactobacillus casei</i>	5
2.3 Senyawa Antibakteri dari Bakteri Asam Laktat	6
2.4 Mekanisme Kerja Antibakteri Bakteri Asam Laktat.....	8
2.5 Bakteri Uji.....	9
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan.....	11
3.3 Alur Penelitian	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.5 Analisis Data	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	17
4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Filtrat Hasil Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	18
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	23

5.1 Kesimpulan	23
5.2 Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN.....	28



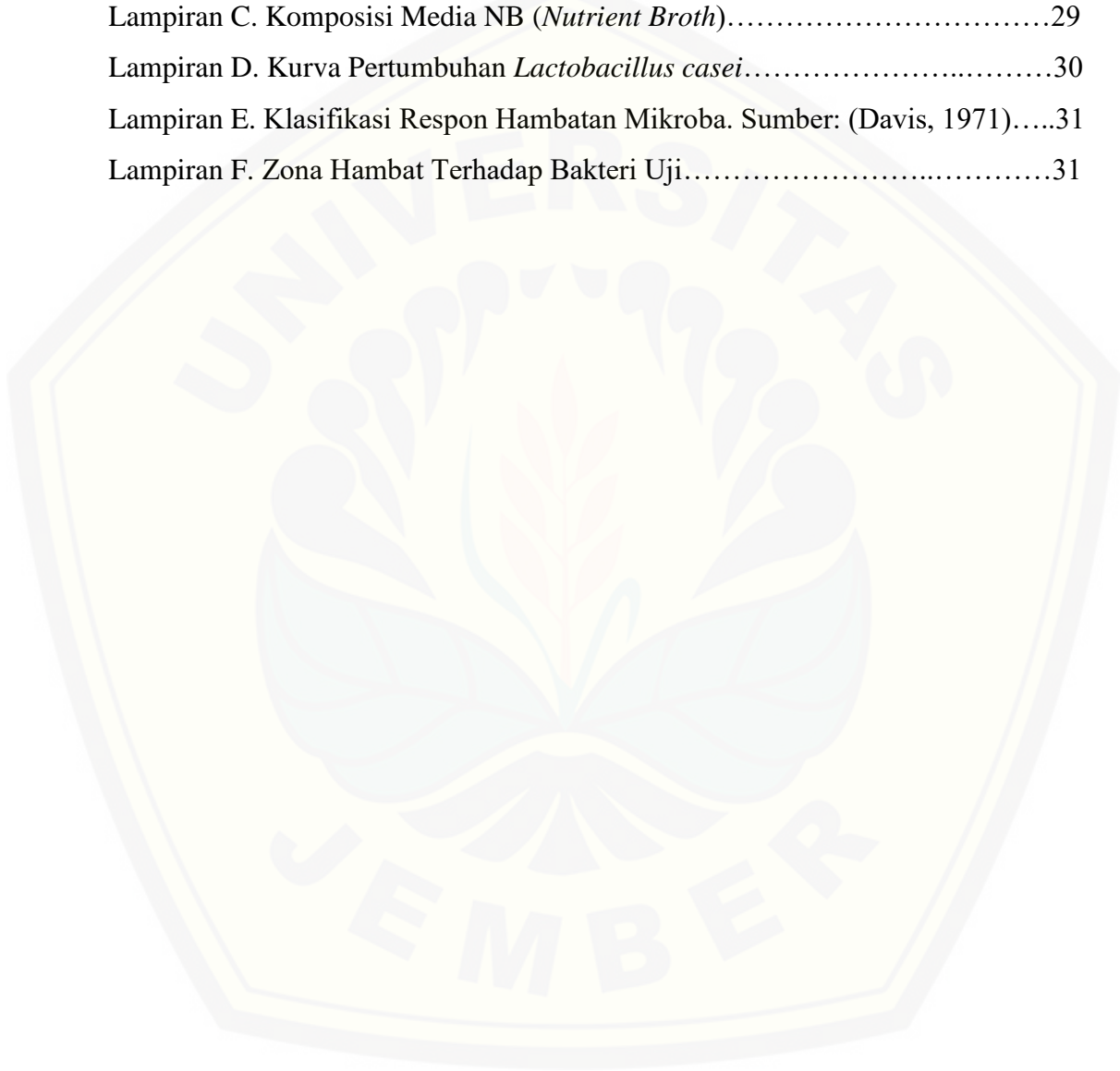
DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>L. casei</i>	17
Gambar 4.2 Diameter Zona Hambat	19
Gambar 4.3 Hasil pengujian aktivitas antibakteri filtrat hasil pertumbuhan <i>L. casei</i> terhadap bakteri <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , dan <i>S. typhi</i>	21



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Media GYP (<i>Glucose Yeast Peptone</i>).....	28
Lampiran B. Komposisi Media NA (<i>Nutrient Agar</i>).....	29
Lampiran C. Komposisi Media NB (<i>Nutrient Broth</i>).....	29
Lampiran D. Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus casei</i>	30
Lampiran E. Klasifikasi Respon Hambatan Mikroba. Sumber: (Davis, 1971).....	31
Lampiran F. Zona Hambat Terhadap Bakteri Uji.....	31





BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri penghasil asam laktat sebagai hasil utama fermentasi karbohidrat. BAL termasuk kelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, dan hidup dalam lingkungan aerobik maupun anaerobik (Quinto *et al.*, 2014). Pemanfaatan BAL oleh manusia telah lama dilakukan. Kelompok bakteri ini telah memegang peranan besar dalam bidang industri makanan khususnya yang berkaitan dengan fermentasi. Berbagai makanan tradisional dari berbagai negara diketahui telah memanfaatkan BAL sebagai salah satu bahan campuran makanan, seperti kimchi, sourdough, dan sauerkraut. Penambahan BAL sebagai bahan campuran makanan berperan untuk mengubah tekstur makanan dengan meningkatkan viskositas bahan dan mengubah rasa yang menghasilkan cita rasa asam. Selain itu, BAL juga berperan sebagai pengawet alami karena mampu menghasilkan komponen senyawa antibakteri (Leroy *et al.*, 2004).

Antibakteri yang dihasilkan oleh BAL diketahui terdiri dari beberapa komponen. Komponen antibakteri tersebut diantaranya terdiri dari asam laktat, asam asetat, bakteriosin, dan komponen penghambat lainnya. Adanya akumulasi dari komponen antibakteri BAL di atas diketahui memiliki daya penghambatan terhadap bakteri lain baik golongan Gram positif dan Gram negatif (Leroy dan De Vuyst, 2010). Oleh sebab itu, BAL menjadi sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agen biopreservatif (industri pengawetan makanan). Potensi tersebut didasarkan juga dengan sifat BAL yang masuk dalam kriteria '*Generally Regarded as Safe*' sehingga tidak menimbulkan resiko kesehatan (Field *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui peranan BAL dalam penghambatan pertumbuhan bakteri patogen. Penelitian oleh Adesokan *et al.*, (2008) menyatakan bahwa *Lactobacillus mesenteroides* diketahui memiliki kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli*. Penelitian oleh Park *et al.*, (2005) menjelaskan bahwa bakteriosin asal *Lactobacillus plantarum* yang diisolasi dari

kimchi dan *Lactotoccus lactis* dari susu sapi mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Salmonella enteritidis*. *Lactobacillus casei* juga diketahui memiliki kemampuan menghambat jenis bakteri dalam spektrum luas. Penelitian oleh Iulietto *et al.*, (2018) menyatakan bahwa isolat *L. casei* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Listeria monocytogenes* yang merupakan salah satu dari bakteri yang sulit dikontrol pada bahan makanan.

Lactobacillus casei merupakan salah satu spesies BAL yang dapat dimanfaatkan sebagai agen biopreservasi. *L. casei* berpotensi diaplikasikan sebagai produsen antibakteri karena termasuk golongan bakteri yang tidak menimbulkan resiko terhadap kesehatan atau dikenal dengan *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Cintas *et al.*, 2001). Penelitian oleh Lu *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa isolat *L. casei* strain TN-2 menghasilkan senyawa antibakteri seperti bakteriosin, asam organik, diasetil, dan hidrogen peroksida. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diketahui salah satu komponen antibakteri *L. casei* yaitu bakteriosin mampu bekerja pada rentang pH lebar yaitu sekitar 2-12. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *L. casei* dapat dimanfaatkan sebagai pengawet alami dalam proses pembuatan makanan baik yang bersifat asam, netral, maupun basa. Hal ini menunjukkan kemampuan *L. casei* sebagai agen biopreservatif berpotensi dimanfaatkan untuk menekan cemaran pertumbuhan bakteri patogen pada bahan makanan.

Berdasarkan latar belakang di atas perlu diadakan penelitian terhadap aktivitas antibakteri filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei* terhadap beberapa bakteri patogen antara lain *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus subtilis* sehingga penggunaan filtrat bakteri asam laktat ini diharapkan mampu mengatasi permasalahan pembusukan bahan makanan dikarenakan pertumbuhan bakteri patogen pada bahan makanan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: Bagaimana aktivitas antibakteri filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* sebagai wakil bakteri komensal, *Salmonella typhi* sebagai wakil Gram negatif, dan *Bacillus subtilis* sebagai wakil Gram positif?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu bakteri *Lactobacillus casei* sebagai bakteri produsen antibakteri ditumbuhkan pada medium GYP (*Glucose, Yeast, Peptone*). Filtrat pertumbuhan *L.casei* diproduksi pada akhir fase eksponensial atau pada awal fase stasioner dan disaring menggunakan filter milipore 0,22 µm. Uji antibakteri menggunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai wakil bakteri komensal, *Salmonella typhi* sebagai wakil Gram negatif, dan *Bacillus subtilis* sebagai wakil Gram positif pada medium NA (*Nutrien Agar*) secara *in vitro*.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh antibakteri filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* sebagai wakil bakteri komensal, *Salmonella typhi* sebagai wakil Gram negatif, dan *Bacillus subtilis* sebagai wakil Gram positif secara *in vitro*.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai sasaran penggunaan filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei* yang tepat, sehingga dapat diaplikasikan secara efektif dan efisien sebagai agen biopreservatif alternatif.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan sekumpulan bakteri yang memiliki kemampuan memproduksi asam laktat sebagai produk utama metabolisme. Bakteri asam laktat dicirikan sebagai kelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, katalase negatif, tidak memiliki sitokrom, toleran terhadap asam, dan hidup dengan cara anaerobik fakultatif (Cogan, 1996). Menurut Axelsson (1998) BAL dikelompokkan ke dalam beberapa genus, yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenoccus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*.

Lactobacillus termasuk salah satu genus BAL yang terdiri dari ribuan spesies. *Lactobacillus* memiliki karakteristik yaitu selnya berbentuk batang dengan susunan berantai, panjang sel $\pm 1-3 \mu\text{m}$, non motil, dan tidak membentuk spora. Karakteristik lain dari genus *Lactobacillus* adalah kemampuannya dalam memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat. Secara fisiologis *Lactobacillus* melakukan fermentasi karbohidrat dengan dua macam cara yaitu homofermentatif ataupun heterofermentatif (Cogan, 1996). Menurut De Vuyst dan Vandame (1994), berdasarkan jalur fermentasi karbohidrat BAL dibagi menjadi tiga golongan, yaitu homofermentatif obligat, heterofermentatif fakultatif, dan heterofermentatif obligat. Bakteri heterofermentatif obligat memfermentasi heksosa dan pentosa menjadi beberapa senyawa yaitu asam laktat, CO₂, etanol, dan asam asetat. Sebaliknya heterofermentatif fakultatif memfermentasi heksosa dan pentosa apabila media tumbuhnya mengandung sedikit glukosa. Bakteri homofermentatif obligat hanya memfermentasi heksosa menjadi asam laktat sedangkan pentosa atau glukonat tidak terfermentasi.

BAL umumnya dikenal sebagai kelompok bakteri yang cukup sulit ditumbuhkan. Hal ini dikarenakan BAL membutuhkan lebih banyak nutrisi untuk dapat tumbuh (Zhu *et al.*, 2009). Nutrisi yang dibutuhkan BAL untuk

pertumbuhannya dapat berupa karbohidrat, asam lemak, dan vitamin (De Angelis dan Gobbetti, 2015). Secara alami, BAL dapat ditemukan pada kondisi lingkungan yang kaya akan karbohidrat seperti air, tanah, dan limbah. BAL juga umum ditemukan dalam bahan makanan fermentasi, seperti daging, sayuran, buah, minuman, dan produk susu. Selain itu, BAL juga ditemukan pada tubuh manusia dan hewan sebagai flora normal seperti pada saluran pencernaan dan saluran genital (Salvetti *et al.*, 2012).

Pemanfaatan BAL oleh manusia telah dilakukan sejak lama. Kelompok bakteri ini telah memegang peranan besar dalam bidang industri makanan khususnya yang berkaitan dengan fermentasi. Pemanfaatan BAL dapat dikategorikan dalam dua macam yaitu sebagai kultur starter maupun kultur non starter. BAL sebagai kultur starter dapat ditemukan pada proses produksi susu fermentasi dan keju dengan beberapa contoh spesies antara lain *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (De Angelis dan Gobbetti, 2015). De Vuyst dan Vandame, (1994) menyatakan bahwa penggunaan BAL banyak dilakukan karena beberapa keunggulan yang dimilikinya. Beberapa keunggulan BAL adalah sebagai berikut:

- a. Tidak menghasilkan senyawa beracun (toksin)
- b. Bersifat mikroaerofilik dan aerotoleran sehingga membutuhkan proses fermentasi sederhana
- c. Mampu memfermentasi substrat sederhana (susu, limbah tanaman, pati terhidrolisis)
- d. Menghambat pembusukan

2.2 Bakteri *Lactobacillus casei*

L. casei termasuk salah satu jenis bakteri asam laktat (BAL) dengan karakteristik sebagai berikut: bakteri Gram positif, berbentuk batang, dengan ukuran sel rata-rata 0.4-0.6 x 2-3 μm . *L. casei* tumbuh pada rentang suhu 27°C hingga 43°C dan akan tumbuh secara optimum pada suhu 37°C (Morishita, 1981). Menurut Salvetti *et al.*, (2012) *L. casei* termasuk kelompok BAL heterofermentatif

fakultatif. *L. casei* banyak dimanfaatkan sebagai bahan dalam produk olahan susu fermentasi. Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* Garrity *et al.*, 2004, *L. casei* diklasifikasikan sebagai berikut:

Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Lactobacillales
Famili : Lactobacillaceae
Genus : *Lactobacillus*
Spesies : *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1919)

2.3 Senyawa Antibakteri dari Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) memegang peranan penting dalam industri pangan karena kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan. Aktivitas penghambatan BAL terjadi sebagai akibat dari adanya akumulasi metabolit primer yaitu asam laktat, asam asetat, etanol, dan karbon dioksida (Delgado *et al.*, 2001). Menurut De Muynck *et al.*, (2004) asam organik yaitu asam laktat dan asam asetat yang dihasilkan BAL mampu berpenetrasi ke dalam membran sel pada kondisi pH rendah. Hal ini menunjukkan jika asam organik (asam laktat dan asam asetat) hanya akan menunjukkan kemampuan antibakteri pada pH asam. BAL pada umumnya menghasilkan asam laktat dengan pKa di bawah 5.

Akumulasi komponen antimikroba pada BAL lainnya yaitu hidrogen peroksida, diasetil, acetoin, dan bakteriosin turut berperan dalam aktivitas penghambatan (Delgado *et al.*, 2001). Istilah bakteriosin dicetuskan pertama kali oleh Jacob *et al.*, (1953) untuk mendeskripsikan aktivitas penghambatan suatu bakteri terhadap spesies bakteri lainnya. Bakteriosin secara sederhana dapat dijelaskan sebagai protein bakteri yang menunjukkan efek antibakteri terhadap spesies yang masih berkerabat dekat (Leistner *et al.*, 1995). Akan tetapi, menurut berbagai penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa bakteriosin juga dapat menghambat spesies berkerabat jauh. Kemampuan penghambatan tersebut

dijelaskan oleh Lu *et al.*, (2014) yaitu bakteriosin asal *L. casei* mampu menekan pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian oleh Nugrahani *et al.*, (2016) juga menjelaskan bahwa bakteriosin asal *Lactobacillus casei* mampu menekan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp*, *Proteus morgani*, dan *Micrococcus sp*.

Bakteriosin berpotensi diaplikasikan sebagai bahan pengawet makanan karena sifatnya yang dapat didegradasi oleh enzim protease dalam tubuh manusia. Sebagai bahan pengawet alternatif, bakteriosin dapat diproduksi secara langsung dalam makanan sebagai hasil pertumbuhan kultur starter (Cleveland *et al.*, 2001). BAL sebagai kultur starter telah lama digunakan sebagai tambahan bahan makanan sehingga dapat dikatakan bakteriosin telah ada dalam makanan dan dikonsumsi sejak lama. Saat ini telah ada dua macam bakteriosin yang telah dijual secara komersial di lebih dari 45 negara dan mendapat persetujuan sebagai bahan pengawet makanan oleh *U.S Food and Drug Administration* (USFDA). Kedua macam bakteriosin tersebut yaitu Nisin yang diisolasi dari *Lactococcus lactis* dan dipasarkan dengan nama dagang Nisaplin® serta Pediocin PA-1 yang dipasarkan dengan nama ganga Alta® 2341 (Yang *et al.*, 2014).

BAL dikenal sebagai golongan bakteri Gram positif yang mampu menghasilkan bakteriosin dengan berbagai ukuran, struktur, sifat fisikokimia, dan spektrum hambat. Menurut Klaenhammer (1993) bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri Gram positif secara umum dikategorikan ke dalam tiga kelas yaitu: kelas I (peptida termodifikasi, lantibiotik), kelas II (peptida tidak termodifikasi), dan kelas III (protein besar, tidak tahan panas). Klasifikasi bakteriosin dalam tiga kelas yaitu sebagai berikut:

- a. Kelas I atau lantibiotik: merupakan peptida kecil (< 5kDa), mengandung asam amino yaitu lanthionine atau β -methyl lanthionine. Asam amino tersebut disintesis melalui modifikasi setelah translasi. Nisin merupakan salah satu contoh bakteriosin kelas I yang paling banyak diketahui.
- b. Kelas II merupakan kelompok peptida kecil (<10 kDa), tahan panas, dan tidak mengandung lantionin. Satu hal yang menjadi karakteristik khas dari golongan kelas II adalah kemampuan penghambatannya terbatas.

- c. Kelas III adalah kelompok peptida besar (>30 kDa) dan tidak tahan panas, Informasi mengenai bakteriosin kelas III masih sedikit sehingga tidak banyak bakteriosin yang teridentifikasi.

Senyawa bakteriosin dapat diaplikasikan pada produk makanan dengan beberapa cara antara lain (i) menginokulasikan langsung BAL pada bahan makanan sebagai kultur starter (ii) menambahkan langsung supernatan bebas sel sebagai bahan tambahan pada makanan (iii) menggunakan bakteriosin yang telah dibentuk kemasan (Woraprayote, 2016).

2.4 Mekanisme Kerja Antibakteri Bakteri Asam Laktat

Asam laktat pada BAL mempunyai pengaruh antagonistik kepada pertumbuhan bakteri lain. Hal ini berkaitan dengan kemampuan asam laktat sebagai senyawa *permeabilizer*. Istilah *permeabilizer* di sini mengacu pada aktivitas asam laktat dalam mengganggu permeabilitas membran luar bakteri. Sifat asam laktat yang mampu larut dalam air, memudahkannya menembus ke dalam periplasma melalui protein porin pada membran luar Gram negatif. Asam laktat merusak lipopolisakarida pada membran luar. Adanya perusakan lipopolisakarida menyebabkan membran luar kehilangan fungsinya sebagai pelindung sel sehingga beberapa komponen antibakteri lainnya seperti bakteriosin masuk ke dalam sel (Alokomi *et al.*, 2000).

Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri patogen oleh bakteriosin dapat berupa pembentukan lubang (pori) pada membran sel target, pengurangan tegangan potensial transmembran, dan pengurangan gradien pH yang berpotensi menyebabkan kebocoran sel (Okereke dan Montville, 1992). Menurut Chen *et al.*, (2007), bakteriosin merupakan molekul positif. Adanya interaksi elektrostatis antara molekul positif bakteriosin dengan muatan negatif pada membran sel target turut berperan dalam proses pengikatan awal bakteriosin dengan sel target. De Vuyst dan Vandem (1994) menyatakan bahwa target utama bakteriosin adalah membran sitoplasma sel target. Bakteriosin menyerang membran sitoplasma dengan cara mengganggu permeabilitas membran sehingga sistem transpot membran

terganggu. Selain itu, bakteriosin juga menghilangkan gaya gerak proton (*proton motive force*) membran sel sehingga produksi energi. Menurut Dimroth *et al.*, (2000) gaya gerak proton berperan dalam mendorong pembentukan ATP dari ADP dan fosfat pada ATP sintase.

2.5 Bakteri Uji

2.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang dengan panjang 2.5 μm , diameter 0.8 μm , yang tidak membentuk spora. Sel dilengkapi organel yaitu pili yang berfungsi untuk melekatkan sel pada substrat serta organel lainnya yaitu flagella yang berfungsi sebagai alat gerak (berenang) (Berg, 2004). *Escherichia coli* hidup dengan cara aerob maupun fakultatif anaerob dengan suhu pertumbuhan 10-40⁰C kendati pertumbuhan optimumnya pada suhu 37⁰C. *Escherichia coli* dapat hidup pada berbagai jenis media seperti media *Mueller-Hinton* agar, *blood* agar, dan *MacConkey* agar (Parija, 2012).

Escherichia coli merupakan flora normal pada usus manusia yang mulai berkolonisasi sejak bayi baru lahir. Koloni dapat tumbuh dengan cepat pada air liur namun tidak ditemukan pada rongga mulut dan faring manusia. Organ pencernaan merupakan tempat yang paling mudah diinvasi *Escherichia coli*. Hal ini dikarenakan *Escherichia coli* dapat dengan mudah tertelan secara tidak sengaja dan masuk ke dalam saluran pencernaan melalui aktivitas makan dan minum. Kasus tertelannya *Escherichia coli* disebabkan oleh beberapa faktor seperti derajat kebersihan seseorang, ke higienisan makanan, dan juga faktor suhu lingkungan (Susman, 1997).

2.5.2 *Salmonella typhi*

Salmonella merupakan bakteri Gram negatif, dengan panjang 2.5 μm , diameter 0.7-0.8 μm dan tidak membentuk spora. *Salmonella* hidup pada kondisi lingkungan aerobik maupun fakultatif anaerobik dengan rentang pH 6-8, sedangkan

suhu pertumbuhan optimumnya adalah 37°C (Parija, 2012). *Salmonella typhi* diketahui sebagai salah satu dari anggota genus *Salmonella* yang merupakan patogen pada manusia. *Salmonella typhi* yang masuk dalam tubuh manusia akan menyebabkan infeksi sistemik dan demam tifoid (Zhang *et al.*, 2008).

2.5.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus merupakan genus bakteri gram positif, berbentuk batang, dan dapat membentuk spora (endospora). Setiap satu sel *Bacillus* hanya menghasilkan satu endospora. Spora yang dihasilkan tersebut memiliki sifat tahan terhadap panas, dingin, kering, radiasi, dan desinfektan. Hal ini yang menyebabkan kontaminasi akibat spora *Bacillus* lebih sulit untuk dihilangkan. Selain itu *Bacillus* juga dikenal sebagai penyebab pembusukan pada bahan makanan. *Bacillus* mengembangkan berbagai kemampuan fisiologis sehingga mampu hidup pada berbagai habitat di alam (Peter, 1996).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2018 sampai dengan November 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

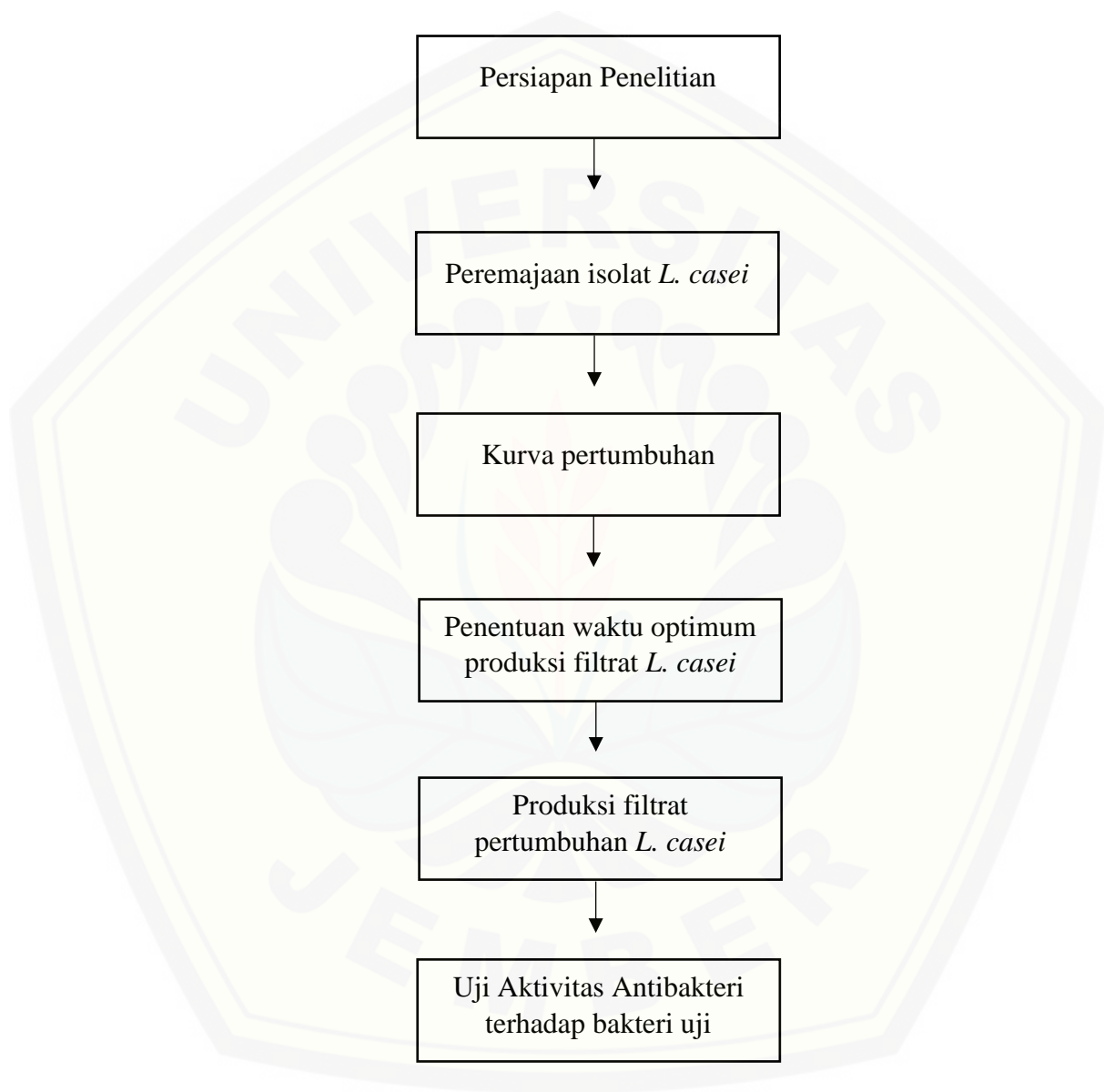
Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sentrifugasi, *laminar air flow*, *autoclave*, *vortex*, mikropipet 100-1000 μ l, mikropipet 10 – 100 μ l, tip, *shaker incubator*, pH meter, lemari pendingin, kompor gas, *hot plate*, bunsen, gelas beker, gelas ukur, batang pengaduk, timbangan, *handsprayer*, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, pipet pasteur, corong, botol *schoot*, *cork borer*, filter milipore 0,22 μ m.

3.2.2 Bahan

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya *Lactobacillus casei* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bakteri uji yang digunakan dalam pengujian aktivitas hambat filtrat hasil pertumbuhan *L. casei* adalah *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Salmonella typhi* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Jember. Medium yang digunakan dalam penelitian ini antara lain GYP (*Glucose, Yeast, Peptone*) yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *L. casei*. Medium *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk menumbuhkan bakteri uji yaitu *E. coli*, *B. subtilis*, dan *S. typhi* serta untuk pengujian aktivitas antibakteri. Selain itu, bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkohol 70%, akuades, media NB (*Nutrient Broth*), dan garam fisiologis (NaCl) 0.85%.

3.3 Alur Penelitian

Alur penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan penelitian. Tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

3.4.1.1 Pembuatan Media Peremajaan *Lactobacillus casei*

Media pertumbuhan untuk bakteri *Lactobacillus casei* adalah media GYP (*Glucose Yeast Peptone*). Pembuatan media GYP Agar dilakukan dengan melarutkan bubuk GYP 25 gram dan Tween 80 10 ml dalam 1000 ml akuades. Kemudian ditambahkan CaCO₃ 0,5 gram dan *Bacto-Agar* 12 gram. Selanjutnya larutan media dipanaskan dengan *hot plate* hingga mendidih, dan dituang dalam cawan petri untuk disimpan pada suhu ruang. Komposisi media dan cara pembuatannya merujuk pada lampiran A.

Pembuatan media GYP *broth* dilakukan dengan melarutkan bubuk GYP 25 gram, CaCO₃ 0,5 gram, dan Tween 80 10 ml ke dalam 1000 ml akuades. Selanjutnya larutan media dipanaskan dengan *hot plate* hingga mendidih, dan dituang dalam erlenmeyer untuk disimpan pada suhu ruang. Komposisi media dan cara pembuatannya merujuk pada lampiran A.

3.4.1.2 Pembuatan Media Peremajaan Bakteri Uji

Media pertumbuhan untuk bakteri uji adalah media NA (*Nutrient Agar*). Pembuatan media NA dilakukan dengan melarutkan bubuk NB 8 gram dan *Bacto-Agar* 15 gram ke dalam 1000 ml akuades. Selanjutnya larutan media dipanaskan dengan *hot plate* hingga mendidih, dan dituang dalam cawan petri untuk disimpan pada suhu ruang. Komposisi media dan cara pembuatannya merujuk pada lampiran B.

Media *Nutrient Broth* (NB) dibuat dengan melarutkan bubuk NB 8 gram dalam 1000 ml akuades. Selanjutnya larutan media dipanaskan dengan *hot plate* hingga mendidih, dan dituang dalam erlenmeyer untuk disimpan pada suhu ruang. Komposisi media dan cara pembuatannya merujuk pada lampiran C.

3.4.2 Peremajaan Bakteri

3.4.3.1 *Lactobacillus casei*

Proses peremajaan bakteri *L. casei* dilakukan dengan menginkolusikan kultur murni pada media padat GYP secara aseptik. Hal ini bertujuan untuk memastikan kultur murni yang digunakan adalah *L. casei*. Selanjutnya, *L. casei* yang tumbuh digoreskan sebanyak 1 ose pada media GYP miring. Pembuatan *stock culture* dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose kultur *L. casei* hasil peremajaan ke dalam 10 ml GYP *broth* dan pembuatan *working culture* dilakukan dengan mencampurkan 10 ml *stock culture L. casei* ke dalam 100 ml GYP *broth* yang kemudian diinkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 24 jam.

3.4.3.2 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*

Bakteri uji yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi* diremajakan menggunakan media *Nutrient Agar* (NA). Peremajaan dilakukan dengan cara menginkolusikan 1 ose kultur pada media NA miring secara aseptik. Selanjutnya, pembuatan *working culture* dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ose kultur hasil peremajaan ke dalam 3 tabung erlenmeyer berisi media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

3.4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus casei*

Pembuatan kurva pertumbuhan *L. casei* dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose kultur pada media GYP *broth*. Selanjutnya, kultur pada GYP *broth* diinkubasi shaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Setiap interval 4 jam, kultur dalam GYP *broth* diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl steril sehingga didapatkan konsentrasi pengenceran 10^{-1} CFU/ml. Pengenceran yang sama dilakukan kembali sehingga diperoleh konsentrasi kultur bakteri 10^{-8} CFU/ml. Masing-masing pengenceran kemudian diambil 10 μ l untuk di *drop* pada media GYP agar dan diinkubasi suhu ruang

selama 48 jam. Koloni yang tumbuh di hitung kurva pertumbuhan dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi (jam) dengan jumlah koloni (CFU/mL).

3.4.4 Produksi Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei*

Produksi filtrat dilakukan pada saat kultur *L. casei* berada pada fase eksponensial atau awal fase stasioner, yaitu pada jam ke 28 waktu inkubasi. Penentuan waktu produksi filtrat tersebut berdasarkan fase pertumbuhan *L. casei* pada kurva pertumbuhan yang telah dilakukan pada langkah sebelumnya. Setelah itu dilakukan produksi filtrat dengan cara mensentrifugasi sebanyak 24 ml biakan *L. casei* dari *working culture* dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) selama 15 menit hingga didapatkan cairan yang telah terpisah dari pelet (sel) yang merupakan supernatan bebas sel. Filtrat yang ingin diambil tersuspensi dalam supernatan dan masih bercampur dengan komponen lain, oleh karena itu dilakukan filtrasi menggunakan filter milipore 0.22 μm sehingga dihasilkan filtrat bebas sel (Nugrahani *et al.*, 2016).

3.4.5 Uji Aktivitas Antagonis Filtrat Hasil Pertumbuhan *Lactobacillus casei* pada media GYP

Uji aktivitas antibakteri filtrat hasil pertumbuhan *L. casei* dilakukan terhadap tiga bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Salmonella typhi*. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran agar. Kultur bakteri uji hasil peremajaan diencerkan dalam larutan fisiologis (NaCl 0.85%). Metode seri pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl steril lalu dihomogenisasi menggunakan vortex sehingga didapatkan konsentrasi pengenceran 10^{-1} CFU/ml. Pengenceran yang sama dilakukan kembali sehingga diperoleh konsentrasi kultur bakteri 10^{-6} CFU/ml. Kultur bakteri uji konsentrasi 10^{-6} CFU/ml sebesar 1 ml dituangkan secara bersamaan dengan media NA yang belum memadat ke dalam cawan petri kemudian dimohogenkan (*pour plate*).

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik jenis streptomisin dengan konsentrasi 430 ppm (b/v), sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades steril.

Sampel filtrat hasil pertumbuhan *L. casei* yang ditumbuhkan pada media GYP selama 28 jam diteteskan sebesar 60 µl ke dalam sumur pada media NA padat dan dibiarkan hingga sampel berdifusi. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan langkah yang sama terhadap sampel streptomisin dan akuades steril sebagai kontrol. Aktivitas antibakteri akan ditandai dengan munculnya zona hambat di sekitar sumur. Zona hambat dihitung menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Aktivitas antibakteri (mm)} = \frac{d1+d2}{2} - x$$

Keterangan:

d1 = diameter vertikal zona hambat pada media (mm)

d2 = diameter horizontal zona hambat pada media (mm)

x = luas sumur (6 mm)

3.5 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif dengan tabel dan gambar dengan jumlah pengulangan sebanyak 3 kali. Data diperoleh berdasarkan hasil pengukuran panjang diameter zona hambat yang terbentuk pada media kultur bakteri uji baik yang telah didifusikan dengan antibakteri filtrat pertumbuhan *L. casei* dan tanpa diberi filtrat hasil pertumbuhan (kontrol positif dan negatif).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Penambahan filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei* terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terhambatnya bakteri, yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi*. Panjang diameter zona hambat dari terbesar ke terkecil adalah *B. subtilis* (5,33 mm), *S. typhi* (4,77 mm), *E. coli* (3,5 mm). Bakteri uji yang mengalami penghambatan pertumbuhan tertinggi adalah *B. subtilis*.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji fitokimia untuk memastikan kandungan senyawa apa saja yang terdapat pada filtrat hasil pertumbuhan *Lactobacillus casei*, sehingga pengaruh antibakteri dapat diketahui lebih optimal. Selain itu, apabila melakukan penelitian dengan memanfaatkan isolat *L. casei* sebagai bahan penelitian sebaiknya isolat tersebut harus sering diremajakan. Tindakan peremajaan ini bertujuan untuk mencegah isolat menjadi sulit ditumbuhkan serta mencegah penurunan mekanisme pertahanan diri.

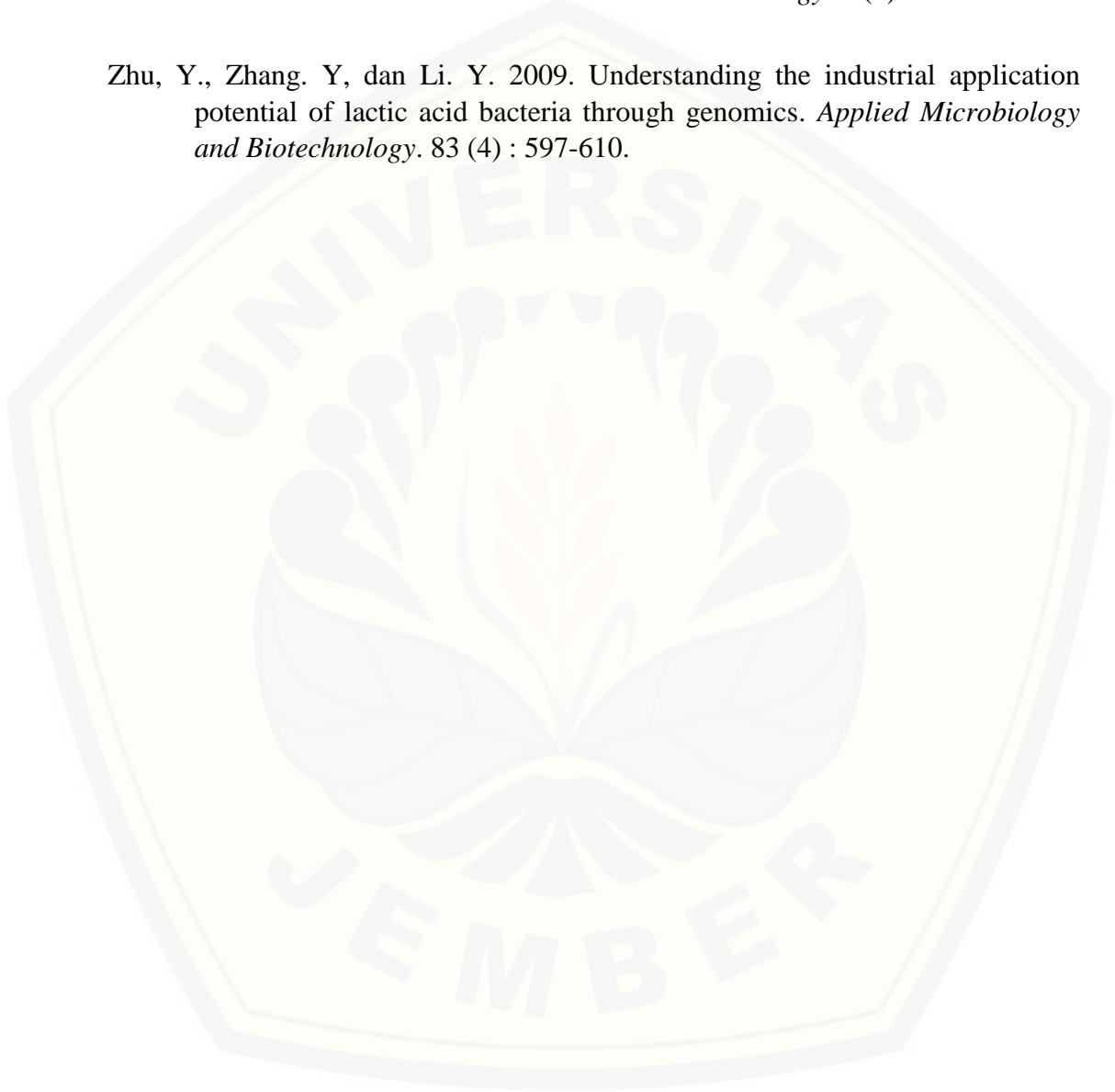
DAFTAR PUSTAKA

- Alokomi, H. L., Skyttä. E, Saarela. M, Mattila-Sandholm. T, Latva-Kala. K, dan Helander. I. M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (5) : 2001-2005.
- Axelsson, L. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*.
- Berg, Howard C. 2004. *E. coli in Motion*. New York: Springer.
- Chen, Y., Ludescher. R. D, dan Montville. T. J. 1997. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (12) : 4770-4777.
- Cintas, L. M., Casaus. M. P, Herranz. C, Nes. I. F, dan Hernández. P. E. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*. 7 (4) : 281-305.
- Cleveland, J., Montville. T. J, Nes. I. F, dan Chikindas. M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71 (1) : 1-20.
- Cogan TM. 1996. *History and Taxonomy of Starter Cultures in Dairy Starter Culture*. TM Cogan and JP Accolas, Eds. VCH Publishers: New York. 1-23.
- Davis, Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal of Microbiology*. 22 (4).
- De Angelis, M., dan Gobbetti. M. 2015. *Lactobacillus* spp.: general characteristics.
- Delgado, A., Brito. D, Fevereiro. P, Peres. C, dan Marques. J. F. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. *Le Lait*. 81 (1-2) : 203-215.
- Delost, Maria Dannessa. 2015. *Introduction of Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*. Burlington: Jones & Bartlett Learning.
- De Muynck, C., Leroy. A. I, De Maeseneire. S, Arnaut. F, Soetaert. W, dan Vandamme. E. J. 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*. 159 (4) : 339-346.

- Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemahannya Special for Woman*. Bogor: Syaamil Al-Qur'an.
- De Vuyst dan Vandame. 1994. *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria*.
- Dimroth, P., Kaim. G, dan Matthey. U. 2000. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F (1) F (o) ATP synthases. *Journal of Experimental Biology*. 203 (1) : 51-59.
- Garrity, G.M., J. A. Bell, dan T. G. Lilburn. 2004. *Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. New York: Springer.
- Hong, W., Zeng. J, dan Xie. J. 2014. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 4 (4) : 258-265.
- Iulietto, M. F., Sechi. P, Cella. E, Grispoldi. L, Ceccarelli. M, Al Ani. A. R, dan Cenci-Goga. B. T. 2018. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a formulation of selected dairy starter cultures and probiotics in an in vitro model. *Italian Journal of Animal Science*.1-6.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 12 (1-3) : 39-85.
- Leistner, L., dan Gorris. L. G. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. 6 (2) : 41-46.
- Leroy, F., dan De. Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004. 15 : 67–78.
- Leroy, Frederic., dan De Vuyst. Luc. 2010. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria to Combat Undesirable Bacteria in Dairy Products. *Australian Journal of Dairy Technology*. 65 (3) :143-149.
- Lü, X., Hu. P, Dang. Y, dan Liu. B. 2014. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food control*. 43 : 276-283.
- Morishita, T., Y. Deguchi, M. Yajima, T. Sakurae, T. Yura. 1981. Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal Bacteriol*. 148 : 64-71.

- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., dan De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6 (12) :1451-1474.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 264 (5157) : 382-388.
- Nugrahani, A., Anik, H, dan Hariati. M. 2016. Characterization of bacteriocin *Lactobacillus casei* on histamine-forming bacteria. *Journal Life Science and Biomedicine*. 6 (1): 15-21.
- Okereke, A. M. E. C. H. I., dan Montville. T. J. 1992. Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Applied and environmental microbiology*. 58 (8) : 2463-2467.
- Parija, Subhash Chandra. 2012. *Textbook of Microbiology & Immunology second edition*. Elsevier.
- Park, J. H., Seok, S. H, Cho, S. A, Baek, M. W, Lee, H. Y, Kim, D. J, dan Park. J. H. 2005. Antimicrobial effect of lactic acid producing bacteria culture condensate mixture (LCCM) against *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. 101 (1): 111-117.
- Peter C. B. Turnbull. 1996. *Medical Microbiology 4th edition*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Qardhawi Yusuf. 1998. *Al-Qur'an Berbicara tentang Akal dan Ilmu Pengetahuan*. Jakarta: Penerbit Gema Insani
- Quinto, E.J., Jimenez, P, Caro, I, Tejero, J, Mateo, J, dan Girbes. T. 2014. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A review. *Food and Nutrition Sciences*. 5: 1765-1775.
- Salvetti, E., Torriani, S, dan Felis. G. E. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 4 (4) : 217-226.
- Susman, Mass. 1997. *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wakil, S. M., dan Osamwonyi. U. O. 2012. Isolation and screening of antimicrobial producing lactic acid bacteria from fermenting millet gruel. *International Research Journal of Microbiology*. 3 (2) : 72-79.

- Woraprayote, W., Malila, Y, Sorapukdee, S, Swetwivathana, A, Benjakul, S, dan Visessanguan, W. 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat science*. 120 : 118-132.
- Zhang, X. L., Jeza, V. T., & Pan, Q. 2008. *Salmonella typhi*: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cellular & Molecular Immunology*. 5 (2).
- Zhu, Y., Zhang, Y, dan Li, Y. 2009. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83 (4) : 597-610.



LAMPIRAN

Lampiran A. KOMPOSISI MEDIA GYP (*GLUCOSE YEAST PEPTON*)

No	Bahan	Jumlah/ Liter
1	Glukosa	10 gr
2	Yeast ekstrak	10 gr
3	Pepton	5 gr
4	Beef ekstrak	2 gr
5	Na asetat	2 gr
6	Tween 80	10 ml
7	CaCO ₃	5 gr
8	<i>Bacto-Agar</i>	12 gr
9	MgSO ₄ 7H ₂ O	400 mg
10	MnSO ₄ 4H ₂ O	20 mg
11	FeSO ₄ 7H ₂ O	20 mg
12	NaCl	20 mg

Langkah – Langkah Pembuatan :

1. Menimbang bahan-bahan yang tercantum di atas menggunakan kertas alumunium foil
2. Memasukkan bahan-bahan di atas ke dalam akuades (volume akuades disesuaikan dengan volume media yang akan dibuat)
4. Larutan medium dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk terus sampai mendidih
5. Mengangkat medium apabila sudah mendidih dan agar sudah larut seluruhnya
6. Memasukkan medium ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml dan 10 ml menggunakan pipet ukur ukuran 10 ml
7. Menutup tabung reaksi dengan kapas sampai tertutup rapat dan tidak ada celah udara
8. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm suhu 121⁰C selama 15-20 menit

Lampiran B. KOMPOSISI MEDIA NA (*NUTRIENT AGAR*)

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	Beef extract	3 gr
2	Pepton	5 gr
3	Agar	15 gr

Langkah – Langkah Pembuatan :

1. Menimbang bahan-bahan yang tercantum di atas menggunakan kertas alumunium foil
2. Memasukkan bahan-bahan di atas ke dalam akuades (volume akuades disesuaikan dengan volume media yang akan dibuat)
4. Larutan medium dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk terus sampai mendidih
5. Mengangkat medium apabila sudah mendidih dan agar sudah larut seluruhnya
6. Memasukkan medium ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan 15 ml menggunakan pipet ukur ukuran 10 ml
7. Menutup tabung reaksi dengan kapas sampai tertutup rapat dan tidak ada celah udara
8. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm suhu 121⁰C selama 15-20 menit

Lampiran C. KOMPOSISI MEDIA NB (*NUTRIENT BROTH*)

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	Beef extract	3 gr
2	Pepton	5 gr

Langkah – Langkah Pembuatan :

1. Menimbang bahan-bahan yang tercantum di atas menggunakan kertas alumunium foil
2. Memasukkan bahan-bahan di atas ke dalam akuades (volume akuades disesuaikan dengan volume media yang akan dibuat)
4. Larutan medium dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk terus sampai mendidih

5. Mengangkat medium apabila sudah mendidih dan agar sudah larut seluruhnya
6. Memasukkan medium ke dalam erlenmeyer sebanyak 30 ml menggunakan pipet ukur ukuran 10 ml
7. Menutup tabung reaksi dengan kapas sampai tertutup rapat dan tidak ada celah udara
8. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm suhu 121°C selama 15-20 menit

Lampiran D. KURVA PERTUMBUHAN *Lactobacillus casei*

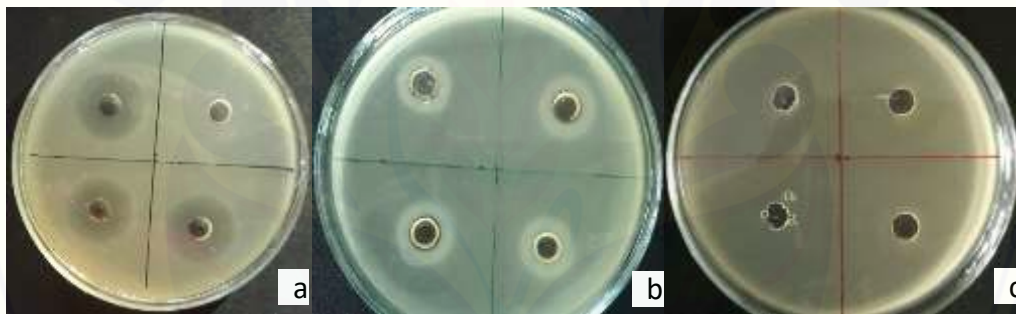
Jam ke-	Pengulangan			rata-rata jumlah koloni cfu/ml	rata-rata log jumlah koloni (cfu/ml)
	1	2	3		
0	$9,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	5,87
4	$1,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$	5,94
8	$8,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5$	5,98
12	$1,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	6,60
16	$1,9 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	7,60
20	$6,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	9,19
24	$1,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,3 \times 10^0$	$1,5 \times 10^9$	9,40
28	$3,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	9,38
32	$2,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	9,38
36	$2,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	9,33
40	$1,6 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	9,24
44	$1,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^9$	9,08
48	$8,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^8$	8,90

Lampiran E. KLASIFIKASI RESPON HAMBATAN MIKROBA oleh (Davis, 1971)

Diameter zona bening (mm)	Respon hambatan pertumbuhan
>20	Sangat kuat
10 – 20	Kuat
5 – 10	Sedang
< 5	Lemah

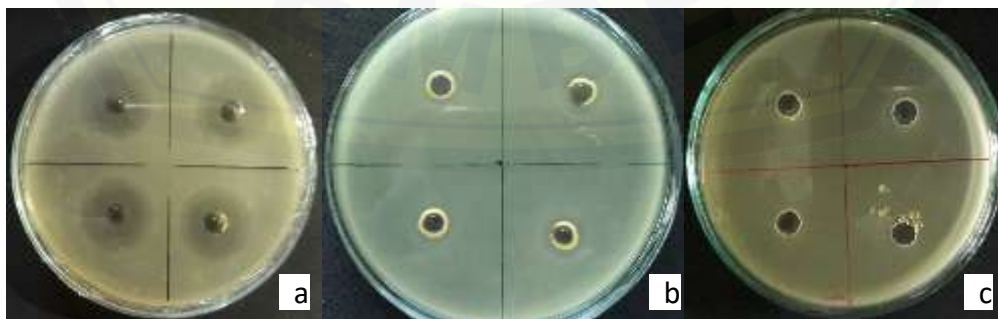
Lampiran F. ZONA HAMBAT ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI UJI

Lampiran F.1 Zona Hambat Antibakteri terhadap *Eschericia coli*

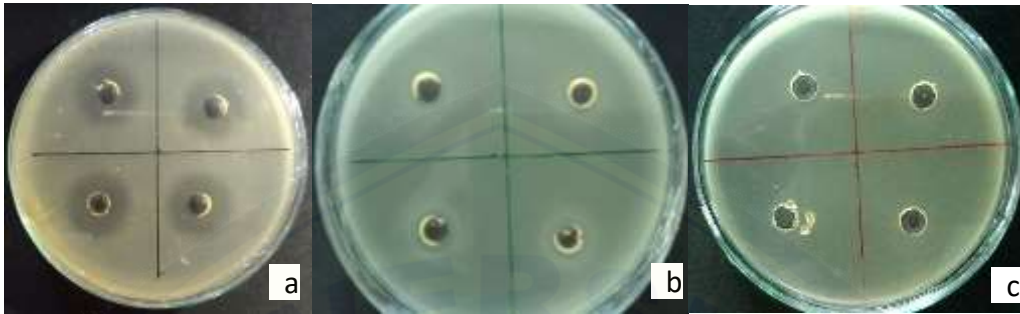


Keterangan Gambar: (a) Kontrol positif (streptomisin 430 ppm); (b) Filtrat *L. casei*; (c) Kontrol negatif akuades steril;

Lampiran F2. Zona Hambat Antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*



Keterangan Gambar: (a) Kontrol positif (streptomisin 430 ppm); (b) Filtrat *L. casei*; (c) Kontrol negatif akuades steril;

Lampiran F3. Zona Hambat Antibakteri terhadap *Salmonella typhi*

Keterangan Gambar: (a) Kontrol positif (streptomisin 430 ppm); (b) Filtrat *L. casei*; (c) Kontrol negatif akuades steril;