

## EKSPLORASI BAKTERIOSIN DARI BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL RUSIP BANGKA DAN KALIMANTAN

### *Exploration of Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria Origin from Bangkanese and Kalimantanese Rusip*

Arifah Kusmarwati<sup>1\*</sup>, Fadila Rachman Arief<sup>2</sup>, dan Sakinah Haryati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan,  
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat, Indonesia

<sup>2</sup> Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Indonesia

\* Korespondensi Penulis: akusmarwati@gmail.com

Diterima: 11 Maret 2014; Disetujui: 3 Juni 2014

#### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari rusip. Rusip merupakan produk ikan fermentasi tradisional Bangka. Penelitian ini menggunakan sampel rusip yang berasal dari Bangka dan Kalimantan. Sampel diisolasi hingga diperoleh isolat murni yang selanjutnya dilakukan skrining untuk memperoleh isolat yang mampu menghasilkan aktivitas antibakteri tertinggi. Isolat terpilih selanjutnya diidentifikasi dan digunakan untuk memproduksi bakteriosin kasar. Bakteriosin kasar diuji sensitifitasnya terhadap enzim proteolitik dan dikarakterisasi melalui pengujian stabilitas terhadap suhu tinggi, pH, surfaktan, serta stabilitasnya selama penyimpanan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat RK4 menghasilkan bakteriosin yang bersifat sensitif terhadap enzim proteolitik seperti proteinase-K dan papain. Bakteriosin tersebut stabil terhadap suhu tinggi dan pH 2–8 serta menghasilkan aktivitas antibakteri yang tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil identifikasi memperlihatkan bahwa isolat RK4 termasuk dalam jenis *Pediococcus pentosaceus* I. Bakteriosin dari *Pediococcus pentosaceus* I tersebut aktivitasnya distimulasi oleh EDTA, *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dan *lauryl sarcosine*. Namun sebaliknya, bioaktivitasnya tidak dipengaruhi oleh Triton X-100, Tween 20, Tween 80 dan urea. Bakteriosin kasar RK4 stabil pada penyimpanan suhu 37 °C selama 4 minggu dan pada suhu dingin selama 2 minggu.

**KATA KUNCI:** bakteriosin, rusip, *Pediococcus pentosaceus* I, suhu tinggi

#### ABSTRACT

Research was conducted to produce and characterize bacteriocin produced by lactic acid bacteria (LAB) isolated from rusip, a traditional Bangkanese fermented fish product. Research used rusip samples from Bangka and Kalimantan. Experiments were started by isolation of lactic acid bacteria from rusip, followed by screening to obtain the best isolate in producing high bacterial inhibition activity. The selected isolate was then identified and used to produce crude bacteriocin. The crude bacteriocin was observed sensitivity to proteolytic enzymes, and characterized, in term of its stability to high temperature, pH, surfactants, and stability during storage. The result showed that RK4 isolate was sensitive to proteolytic enzyme, i.e proteinase-K and papain. The bacteriocin was heat stable, stable at pH 2–8, and produced the highest inhibition activity to *Staphylococcus aureus*. Identification result showed that RK4 isolate was *Pediococcus pentosaceus* I. Bacteriocin which was identified as *Pediococcus pentosaceus* was stimulated by EDTA, *sodium dodecyl sulphate* (SDS) and *lauryl sarcosine*. On the contrary, bioactivity of bacteriocin was not affected by Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and urea. Meanwhile, crude bacteriocin RK4 was also stable at storage temperature of 37 °C for 4 weeks and cold temperature for 2 weeks.

**KEYWORDS:** bacteriocin, rusip, *Pediococcus pentosaceus* I, high temperature

#### PENDAHULUAN

Bakteriosin didefinisikan sebagai senyawa antimikrobia yang disintesis oleh berbagai spesies

bakteri termasuk kelompok bakteri asam laktat (BAL) di dalam ribosom. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memperlihatkan aktivitas antibakteri (bakterisida ataupun bakteriostatik) terhadap spesies

bakteri yang bersifat sensitif. Protein ini seringkali aktif melawan spesies lain yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan mikroorganisme penghasil (Klaenhammer, 1988; Kaiser *et al.*, 1993 *dalam* Galvez *et al.*, 2007). Beberapa BAL memproduksi bakteriosin dengan spektrum penghambatan luas. Beberapa bakteriosin juga berpotensi sebagai pengawet pangan. Penggunaan bakteriosin pada industri pangan dapat membantu mengurangi penggunaan bahan pengawet kimiawi ataupun perlakuan panas yang intensif. Dalam hal ini penggunaan bakteriosin secara alami akan memberikan nutrisi dan sifat organoleptik yang lebih baik (Galvez *et al.*, 2007). Selain itu bakteriosin yang berasal dari bakteri asam laktat dikatakan sangat menarik disebabkan ia merupakan bahan tambahan pangan yang aman dan tidak toksis untuk pengawet pangan dan mampu mencegah kerusakan pangan oleh bakteri patogen yang berifat Gram Positif (Morisset *et al.*, 2004 *dalam* Hata *et al.*, 2010). Melalui penelitian yang sangat intensif, nisin terbukti sebagai satu-satunya bakteriosin yang dapat diaplikasikan pada industri pangan dan telah dipasarkan hingga lebih dari 48 negara (De Arauz *et al.*, 2009). Hingga saat ini nisin telah digunakan sebagai pengawet alami pada produk keju dan makanan kaleng di berbagai negara antara lain Argentina, Australia, Brazil, Italia, Belanda, AS dan Inggris. Dosis nisin yang dipergunakan mulai dari 100 UI/ml hingga tidak terhingga (Cleveland *et al.*, 2001 *dalam* De Arauz *et al.*, 2009).

Beberapa bakteriosin diproduksi dari bakteri asam laktat yang berasosiasi dengan produk-produk fermentasi. Beberapa bakteriosin terbaru dari produk fermentasi antara lain : bakteriosin yang diisolasi dari produk daging terfermentasi asal Turki (Con & Goëkalp, 2000), bakteriosin asal Brazilia (De Martinis & Freitas, 2003), bakteriosin dari produk fermentasi asal Burkina Faso (Omar *et al.*, 2006), bakteriosin yang diisolasi dari produk daging fermentasi tradisional China (Liu *et al.*, 2008), bakteriosin dari sosis kering (Castro *et al.*, 2011), bakteriosin dari produk daging kering fermentasi asal Brasil (Biscola *et al.*, 2013) dan bakteriosin yang diisolasi dari pasta udang asal Thailand (Kaewkloma *et al.*, 2013). Bakteriosin lain juga dihasilkan oleh strain *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* 13, *Lactobacillus plantarum* A-1, *Lactobacillus curvatus* MBSa2, *Bacillus licheniformis* P40, *Lactobacillus plantarum* 17.2b, dan *Lactobacillus pentosus* B96 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2007; Alegria *et al.*, 2010; Altuntas *et al.*, 2010; Hata *et al.*, 2010; Hurtado *et al.*, 2011; Biscola *et al.*, 2013; dan Barbosa *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini beberapa strain bakteri asam laktat telah diseleksi dengan maksud untuk

memperoleh bakteriosin baru. Sebuah isolat yang mampu menghasilkan bakteriosin (isolat RK4) telah berhasil diisolasi dari rusip. Rusip merupakan salah satu produk fermentasi ikan yang berasal dari Indonesia. Rusip terbuat dari ikan, garam, gula aren, dan beras, namun terkadang tanpa beras, yang selanjutnya difermentasi secara anaerob selama 7–14 hari (Yuliana, 2007). Rusip terutama diproduksi di Propinsi Kepulauan Bangka Belitung yang secara luas digunakan sebagai campuran sambal dan dikonsumsi bersama nasi dan lalapan. Pada umumnya rusip mengandung bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Enterococcus* (Dessi, 1999 *dalam* Yuliana, 2007; Wijaya, 2007 *dalam* Sakti (2009)).

Meskipun beberapa penelitian bakteriosin yang dihasilkan oleh produk pangan dari Indonesia pernah dilaporkan, namun eksplorasi bakteriosin yang dihasilkan dari produk fermentasi asli Indonesia masih sangat terbatas. Diantaranya telah dilaporkan adanya bakteriosin yang berasal dari produk daging yang dikemas vakum dan susu yang berasosiasi dengan bakteri asam laktat (Rahayu *et al.*, 1999; Kusmiati & Malik, 2002; Nugroho & Rahayu, 2003; Usmiati & Marwati, 2007; Syahniar, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri asam laktat dari rusip, selanjutnya memproduksi dan mengkarakterisasi bakteriosin dari isolat terpilih yang aktivitasnya stabil pada suhu tinggi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rusip komersial yang diperoleh dari Bangka dan Kalimantan pada tahun 2013. Sampel rusip Bangka berasal dari pasar tradisional kota Pangkalpinang dan pengolah rusip asal kota Mentok, sementara sampel rusip Kalimantan berasal dari pengolah rusip asal kota Mempawah (Kalimantan Barat). Keseluruhan sampel telah diproduksi dalam jangka waktu yang berbeda-beda.

Bakteri indikator untuk uji aktivitas bakteriosin yaitu *Lactococcus lactis*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Vibrio* sp. Media *man rogosa and sharpe* (MRS) broth dan agar, CM sukrose (Sukrose 1%, *yeast extract* 1%, pepton 0,45%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,84%, NaCl 0,2%,  $\text{MgSO}_4$  0,02%,  $\text{MnSO}_4$  0,005%) dan *brain heart infussion* (BHI) digunakan sebagai media pertumbuhan Bakteri Asam Laktat (BAL) penghasil bakteriosin, sedangkan media muller hinton agar (MHA) digunakan sebagai media untuk pengujian aktivitas bakteriosin.

## Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

### Pertumbuhan awal BAL

Bakteri asam laktat (BAL) ditumbuhkan dengan cara memasukkan sampel rusip sebanyak 10 gr ke dalam media MRS broth yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24–48 jam.

### Isolasi BAL

Bakteri asam laktat diisolasi langsung dari rusip komersial yang terlebih dahulu ditumbuhkan selama 24–48 jam pada media MRS broth. Metode yang digunakan adalah metode pengenceran yang dilanjutkan dengan *plating* secara *pour plate* (Rahayu & Margino, 1997). Media yang digunakan untuk isolasi BAL adalah MRS agar ditambah 1% CaCO<sub>3</sub> dengan pH 5. Inkubasi BAL dilakukan pada suhu 35 °C selama 48 jam. Pemilihan isolat yang diduga sebagai BAL didasarkan pada pembentukan zona bening di sekitar koloni. Koloni yang membentuk zona bening selanjutnya digores (*distreak*) untuk menghasilkan koloni tunggal. Koloni tunggal digores 2–3 kali pada MRS agar hingga diperoleh isolat murni/tunggal. Isolat tunggal yang dihasilkan diidentifikasi secara kualitatif dengan pewarnaan Gram, uji katalase dan uji oksidase. Isolat murni yang bersifat Gram (+), katalase (-) dan oksidase (-) merupakan isolat BAL.

Penyimpanan isolat dilakukan pada suhu 4 °C dalam media CM sukrose agar miring. Isolat terpilih yang disimpan pada suhu 4 °C disegarkan kembali (*direfresh*) dengan media cair CM sukrose ketika akan dipergunakan. Isolat yang tumbuh pada media tersebut selanjutnya diseleksi untuk memperoleh BAL yang menghasilkan senyawa antimikroba.

### Skrining BAL Penghasil Senyawa Antimikroba

Seleksi isolat BAL penghasil senyawa antimikroba dilakukan menggunakan metode spot agar (*agar spotted on the lawn method*) (Abrams et al., 2011) secara aerobik. Bakteri indikator yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari Remel® (UK), *Lactococcus lactis*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *Listeria monocytogenes* dan *Vibrio* sp. Cawan agar diinokulasi dengan 100 µl strain indikator yang terlebih dahulu ditumbuhkan pada media *nutrient* broth. Aktivitas daya hambat melawan strain indikator diuji menggunakan *Muller Hinton Agar* (MHA). *Muller Hinton Agar* yang mengandung strain indikator dispot/ditetesi dengan 10 µl kultur BAL. Dengan cara demikian, maka satu cawan dapat digunakan untuk menguji sekaligus 8–10 isolat BAL. Selanjutnya dilakukan inkubasi semalam pada suhu 37 °C. Isolat yang memiliki

kemampuan untuk menghambat bakteri indikator akan memberikan zona jernih di sekitar spot.

### Produksi Bakteriosin Kasar

Produksi bakteriosin kasar mengacu pada Ogunbanwo et al. (2003). Isolat yang telah diseleksi dan menunjukkan aktivitas antimikroba ditumbuhkan pada CM sukrose pada suhu 35 °C selama 48 jam. Kultur sel yang terbentuk disentrifugasi (8.000 rpm, suhu 4 °C selama 15 menit) untuk mendapatkan supernatannya. Supernatan bebas sel diatur pHnya (pH 6) dengan menambahkan 1 M NaOH (dengan maksud untuk menghilangkan pengaruh asam organik), lalu difiltrasi dengan filter asetat selulose 0,2 µm. Selanjutnya supernatan bebas sel dipanaskan pada suhu 80 °C selama 10 menit untuk menghilangkan aktivitas proteolitik dan hidrogen peroksida. Supernatan bebas sel merupakan bakteriosin kasar.

### Pengujian Bakteriosin

Uji aktivitas bakteriosin dilakukan menggunakan metode difusi sumur agar (Ogunbanwo et al., 2003; Udhayashree et al., 2012). Sebanyak 100 µl bakteri indikator diinokulasi pada media MHA, kemudian dibuat sumuran berdiameter 6 mm pada agar yang telah memadat. Pada setiap sumuran dimasukkan sebanyak 10 µl bakteriosin kasar. Cawan MHA kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam. Aktivitas bakteriosin ditunjukkan dengan adanya zona bening/halo yang tegas di sekitar sumuran. Aktivitas bakteriosin dinyatakan sebagai Arbitrari Unit (AU) per ml. Satu AU dinyatakan sebagai luas zona hambat per satuan volume sampel bakteriosin yang diuji (mm<sup>2</sup>/ml) (Usmiati & Marwati, 2007).

$$\text{Aktivitas bakteriosin (mm}^2\text{/ml)} = \text{AU/ml} \\ = \frac{\text{Lz} - \text{Ls}}{\text{V}}$$

Keterangan/Note:

Lz = luas zona bening (mm<sup>2</sup>)

Ls = luas sumuran (mm<sup>2</sup>)

V = volume sampel (mL)

### Konfirmasi BAL Penghasil Bakteriosin

Untuk mengkonfirmasi supernatan BAL yang merupakan bakteriosin dilakukan pengujian aktivitas supernatan tersebut terhadap enzim proteolitik. Supernatan yang kehilangan aktivitas setelah direaksikan dengan enzim proteolitik merupakan bakteriosin sesungguhnya. Enzim proteolitik yang digunakan adalah papain dan proteinase K. Pengujian pengaruh enzim dilakukan sebagai berikut : Sebanyak

200 µl supernatan bakteriosin dilarutkan dalam 20 µl larutan enzim (larutan enzim dibuat dengan cara melarutkan enzim dalam NaOH atau fosfat buffer pH 7), lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. Supernatan BAL yang sensitif terhadap proteinase-K dan papain dipertimbangkan sebagai bakteriosin yang sesungguhnya dan dipilih untuk pengujian berikutnya. Supernatan yang sensitif terhadap enzim proteolitik adalah supernatan tanpa zona bening/halo yang tegas di sekitar sumuran, dan dinyatakan sebagai bakteriosin.

### **Karakterisasi Bakteriosin**

#### **Pengaruh pH**

Sebanyak 5 ml larutan bakteriosin kasar pada tabung yang berbeda, masing-masing diatur pH nya pada pH 2, 4, 6, 8, dan 10 menggunakan larutan NaOH atau HCl. Setelah diinkubasi selama 4 jam pada suhu kamar, selanjutnya aktivitas bakteriosin diuji menggunakan metode difusi sumuran agar. Aktivitas bakteriosin dinyatakan dalam AU/ml (Usmiati & Marwati, 2007).

#### **Pengaruh surfaktan**

Surfaktan yang digunakan antara lain : triton x-100, Tween 20, tween 80, sodium dodecyl sulfat/SDS, EDTA, Urea dan N-Laurylsarcosine. Surfaktan ditambahkan ke dalam masing-masing larutan bakteriosin kasar pada konsentrasi 0,1 ml atau 0,01 g surfaktan per ml bakteriosin. Larutan bakteriosin kasar tanpa surfaktan digunakan sebagai kontrol. Sampel maupun kontrol diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas bakteriosin menggunakan metode difusi sumuran agar. Aktivitas bakteriosin dinyatakan dalam AU/ml.

#### **Spektrum aktivitas antibakteri bakteriosin**

Aktivitas antibakteri bakteriosin diuji terhadap beberapa bakteri indikator (*L. plantarum*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *E. coli*) menggunakan metode difusi sumuran agar. MHA diinokulasi dengan 100 µl *L. plantarum* yang terlebih dahulu ditumbuhkan pada MRS cair, sedangkan *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *E. coli* ditumbuhkan pada *nutrient broth* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sumuran berdiameter 6 mm pada MHA plate disiapkan dan sebanyak 10 µl bakteriosin kasar ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran. Cawan MHA kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antimikroba dinyatakan positif jika terbentuk zona bening/halo yang

tegas di sekitar sumuran. Aktivitas bakteriosin dinyatakan dalam AU/ml.

#### **Uji ketahanan terhadap suhu**

Bakteriosin diambil 200 µl kemudian di uji ketahanannya terhadap suhu 50 °C selama 20 menit, 100 °C selama 20 menit dan 121 °C selama 15 menit (Osmanagaoglu *et al.*, 1998; Mandal *et al.*, 2008).

#### **Stabilitas bakteriosin selama penyimpanan**

Uji stabilitas dilakukan dengan cara menyimpan bakteriosin pada suhu -20, 4, dan 37 °C selama 2 bulan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode diffuse agar (Nugroho & Rahayu, 2003).

#### **Identifikasi**

Isolat terpilih penghasil bakteriosin diidentifikasi menggunakan API 50 CH strip dan API 50 CHL medium (API systems, Biomerieux Sa, Franch).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)**

Skrining/penapisan bakteri asam laktat dilakukan terhadap 18 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari rusip (Tabel 1). Berdasarkan penapisan tersebut dihasilkan 12 isolat bakteri asam laktat. Berdasarkan hasil analisis pengecatan Gram kedua belas bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif, serta menunjukkan hasil uji katalase dan oksidase negatif.

Axelsson (2004) menerangkan bahwa bakteri asam laktat tipikal merupakan bakteri yang bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, katalase negatif, tidak memiliki sitokrom, habitat non aerobik namun bersifat *aerotolerant*, *acid tolerant*, dan sangat fermentatif, asam laktat merupakan produk akhir yang utama selama fermentasi gula.

### **Skrining BAL penghasil senyawa antimikroba**

Tahap berikutnya adalah melakukan skrining BAL penghasil senyawa antimikroba terhadap 12 isolat BAL. Dari 12 isolat BAL yang diskriminasi terdapat 4 isolat yang memiliki aktivitas antimikroba, yaitu RK1, RK2, RK4, dan RAI (Tabel 2). Seleksi BAL yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba dilakukan dengan metode spot agar (*agar spotted on the lawn method*) pada media Muller Hinton Agar (MHA). Pada seleksi tersebut digunakan bakteri uji *Vibrio sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, dan *Lactococcus lactis*. Hasil

Tabel 1. Data isolat bakteri asam laktat (BAL) dari rusip  
 Table 1. Data of lactic acid bacteria isolate (LAB) from rusip

No.	Asal Isolat/ Origin of Isolate	Isolat/Isolate	Uji Katalase/ Catalase Test	Uji Oksidase/ Oxidase Test	Pewarnaan Gram/ Gram Staining
1.	Bangka	RTB1. 1	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
2.	Bangka	RTB1. 2	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
3.	Bangka	RTB1. 3	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
4.	Bangka	RTB2. 1	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
5.	Bangka	RTB2. 2	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
6.	Bangka	RTB2. 3	Positif (+)	Negatif (-)	Gram positif (+)
7.	Bangka	RAI. 1	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
8.	Bangka	RAI. 2	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
9.	Kalimantan	RK1. 1	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
10.	Kalimantan	RK1. 2	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
11.	Kalimantan	RK1. 3	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
12.	Kalimantan	RK2. 1	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
13.	Kalimantan	RK2. 2	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
14.	Kalimantan	RK2. 3	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
15.	Kalimantan	RK2. 4	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
16.	Kalimantan	RK4. 1(RK4)	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
17.	Kalimantan	RK4. 2	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)
18.	Kalimantan	RK4. 3	Negatif (-)	Negatif (-)	Gram positif (+)

aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dapat dilihat pada Tabel 2.

Keempat isolat memperlihatkan spektrum penghambatan yang sempit, yaitu hanya mampu menghambat *Staphylococcus aureus* dari kelompok bakteri Gram positif. Hasil ini serupa dengan Mathieu *et al.* (1993) dan Hechard *et al.* (1992) dalam De Martins & Freitas (2003) yang melaporkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat tidak efektif dalam menghambat bakteri Gram negatif.

Hal ini kemungkinan berhubungan dengan adanya lapisan lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri Gram negatif yang melindungi membran sel, sebagai lokasi target bakteriosin (Stevens *et al.*, 1991 dalam De Martins & Freitas, 2003). Selain itu daya hambat yang dihasilkan oleh keempat isolat kemungkinan juga disebabkan oleh adanya kompetisi nutrisi, asam laktat, diasetil, dan hidrogen peroksida (Klaenhammer, 1988 dalam Liu *et al.*, 2008; Abrams *et al.*, 2011). Berdasarkan hal tersebut, maka untuk pengujian

Tabel 2. Aktivitas antimikroba BAL  
 Table 2. Antimicrobe activity of LAB

No.	Kode/ Code	Zona Hambat Isolat (mm)/ Inhibition Zone of Isolate (mm)					
		<i>Vibrio</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. lactis</i>
1.	RK1	0	2.0 mm	0	0	0	0
2.	RK2	0	5.0 mm	0	0	0	0
3.	RK4	0	5.0 mm	0	0	0	0
4.	RAI	0	5.0 mm	0	0	0	0

selanjutnya hanya digunakan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri uji. Selanjutnya terhadap keempat isolat BAL yang memiliki aktivitas antimikroba dilakukan pengujian aktivitas supernatannya terhadap enzim proteolitik. Uji tersebut dilakukan untuk tujuan konfirmasi yang membuktikan bahwa supernatan yang dihasilkan oleh isolat BAL merupakan bakteriosin yang sesungguhnya.

### Konfirmasi BAL penghasil bakteriosin

Bakteriosin adalah substrat dengan sifat alami protein sehingga sensitif terhadap aktivitas enzim proteolitik, diantaranya papain dan proteinase-K. Keempat isolat BAL yang memiliki aktivitas antimikroba selanjutnya dikonfirmasi kemampuannya sebagai penghasil bakteriosin melalui uji sensitifitas BAL tersebut terhadap aktivitas enzim proteolitik. Hasil uji sensitifitas bakteriosin terhadap enzim proteolitik dapat dilihat pada Tabel 3.

Aktivitas antibakteri dari supernatan RK2 masih ada setelah ditambahkan dengan enzim papain. Mekanisme penghambatan strain ini kemungkinan disebabkan oleh kompetisi substrat atau pengasaman media (Osmanagaoglu *et al.*, 1998). Penambahan enzim proteinase-K menyebabkan hilangnya aktivitas antimikroba pada RK1, RK2, dan RK4. Sementara RAI masih menunjukkan adanya aktivitas.

Supernatan yang dihasilkan oleh RK4 (Rusip Kalimantan) masih menunjukkan aktivitas sebelum diberi perlakuan enzim proteolitik, namun aktivitas supernatan menjadi hilang ketika diberi perlakuan enzim Proteinase-K dan papain. Papain merupakan enzim hidrolase sistein protease yang ada pada pepaya. Enzim proteinase-K dan papain keduanya merupakan enzim proteolitik (enzim pemecah protein). Karena pada dasarnya bakteriosin merupakan senyawa protein, maka keberadaan kedua enzim proteolitik tersebut di dalam sistem larutan enzim bakteriosin menyebabkan hilangnya aktivitas

bakteriosin. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan RK4 (Rusip Kalimantan) memiliki karakteristik yang sama seperti bakteriosin. Hasil uji sensitivitas keempat bakteri tersebut (RK1, RK2, RK4, dan RAI) terhadap aktivitas enzim proteolitik (Tabel 3) memperlihatkan bahwa RK4 memiliki karakteristik yang terbaik sebagai penghasil bakteriosin. Selanjutnya terhadap supernatan isolat RK4 dilakukan pengujian karakterisasi bakteriosin. Bakteriosin dinyatakan sebagai protein atau senyawa protein yang memiliki sifat antagonis terhadap bakteri (De Vuyst & Vandamme, 1994). Sebagai senyawa antibakteri, bakteriosin bersifat sensitif terhadap enzim proteolitik, mengalami inaktivasi sempurna atau tereduksi secara signifikan setelah diberi perlakuan enzim proteinase-K, pronase dan tripsin (Todorov & Dicks, 2005; Biscola *et al.*, 2013). Proteinase-K dan pepsin sangat kuat menghambat produksi bakteriosin, sementara  $\alpha$ -amilase, DNase, RNase dan lipase tidak menghambat produksi bakteriosin (Rajaram *et al.*, 2010).

### Karakterisasi bakteriosin

#### Pengaruh pH

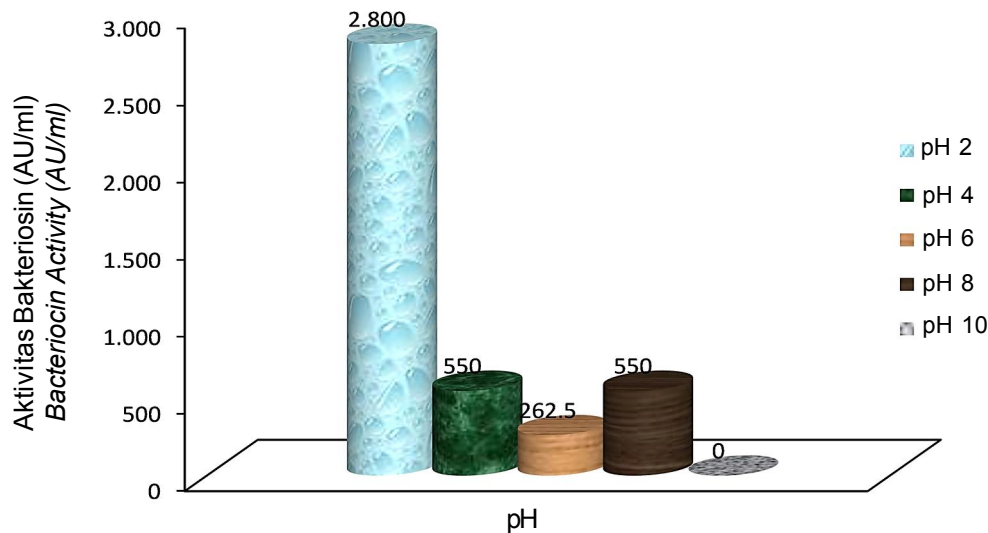
Produksi bakteriosin tergantung pada kondisi pH, dengan kata lain pH sangat berperan dalam produksi bakteriosin (Lejeune *et al. dalam* De Vuyst & Leroy, 2007; Delgado *et al. dalam* Altuntas *et al.*, 2010). Hasil uji sensitifitas bakteriosin terhadap pH disajikan pada Gambar 1.

Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus sakei* R1333 yang masih stabil aktivitasnya setelah diinkubasi pada pH 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; dan 12,0, namun hasilnya serupa dengan bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. brevis* OG1 yang masih stabil pada pH 2–8 (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Todorov *et al.*, 2011a). Pada penelitian ini, hilangnya aktivitas

Tabel 3. Pengaruh enzim proteolitik terhadap aktivitas bakteriosin  
Table 3. Effect of proteolytic enzyme on bacteriocin activity

Perlakuan Enzim/ Enzyme Treatments	Konsentrasi (mg/ml)/ Concentration (mg/ml)	Aktivitas Bakteriosin/Bacteriocin Activity			
		RK1	RK2	RK4	RAI
Kontrol	-	+	+	+	+
Papain	0.1	-	+	-	-
Proteinase-K	0.1	-	-	-	+

Keterangan/Note: Kontrol adalah larutan bakteriosin tanpa diberi perlakuan enzim/  
Control was bacteriocin solution without enzyme treatment



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas bakteriosin.  
Figure 1. Effect of pH on bacteriocin activity.

bakteriosin pada pH 10 kemungkinan disebabkan terdegradasi oleh enzim proteolitik, agregasi protein, diserap oleh sel penghasil dan regulasi umpan balik (Parente *et al.*, 1994 dalam Todorov & Dicks, 2006). Degradasi bakteriosin terjadi seiring dengan fase kematian sel penghasil. Awalnya sel mengalami lisis kemudian diikuti dengan akumulasi protease intraseluler yang menyebabkan rusaknya bakteriosin (Avonts *et al.*, 2004).

#### **Stabilitas terhadap panas**

Bakteriosin RK4 (Rusip Kalimantan) memiliki stabilitas panas yang kuat bahkan setelah disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Berdasarkan karakter ini maka bakteriosin tersebut dapat digunakan sebagai pengawet makanan yang diolah dengan suhu tinggi, di samping berperan penting untuk aplikasi pengolahan dan konservasi pangan (Gao *et al.*, 2010). Hasil serupa telah dilaporkan pada bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* F1 dan *L. brevis* OG1 yang masih menunjukkan aktivitas pada pemanasan suhu 100 °C selama 10–30 menit dan pemanasan pada suhu 121 °C selama 10–60 menit. Penelitian lain menyebutkan bahwa bakteriosin ST16Pa masih stabil setelah dipanaskan pada suhu 25–100 °C selama 2 jam dan tidak terjadi pengurangan aktivitas setelah diberi perlakuan suhu 121 °C selama 20 menit pada pH 6,0 (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Todorov & Dicks, 2006; Todorov *et al.*, 2011b).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh RK4 masih menunjukkan aktivitas ketika diberi perlakuan panas pada suhu 50, 100, dan 121 °C (Tabel 4) sehingga sementara diduga bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh RK4 (Rusip Kalimantan) adalah

bakteriosin. Masih adanya aktivitas antibakteri oleh bakteriosin ketika diberi perlakuan panas diduga karena bakteriosin merupakan peptida pendek yang stabil terhadap panas. Selain itu karena adanya asam amino tertentu pada bakteriosin tersebut yang mampu mempertahankan struktur bakteriosin dari pengaruh panas (Ray, 1992; Rahayu *et al.*, 2004).

#### **Pengaruh surfaktan**

Penambahan surfaktan dapat mempengaruhi aktivitas bakteriosin. Dalam hal ini, surfaktan EDTA, SDS, dan *laurylsarcosine* dapat meningkatkan aktivitas bakteriosin. Dilaporkan telah terjadi laju adsorpsi bakteriosin yang tinggi dengan keberadaan senyawa kimiawi seperti NaCl, gliserol dan SDS. Adsorpsi bakteriosin terhadap sel target sangat penting karena sebagai perantara terjadinya insersi bakteriosin ke dalam membran sel dan dalam membentuk pori yang menjadi sebab terjadinya kematian sel (Todorov, 2009 dalam Biscola *et al.*, 2013). Sebaliknya, bioaktivitas bakteriosin RK4 tidak dipengaruhi oleh triton x-100, tween 20, tween 80, dan urea. Pengaruh surfaktan terhadap aktivitas bakteriosin disajikan pada Gambar 2. EDTA diketahui memiliki aktivitas antimikroba terutama terhadap bakteri Gram negatif. Dalam hal ini, EDTA dapat mengganggu struktur membran luar dan memberi akses bagi molekul hidrofobik masuk ke dalam membran sitoplasma (Vaara, 1992 dalam Kusmarwati *et al.*, 2012). Sementara itu, surfaktan non ionik triton x- 100, tween 80 dan tween 20 tidak berpengaruh terhadap aktivitas bakteriosin (meskipun penelitian lain melaporkan bahwa penambahan deterjen non ionik untuk berbagai makanan dapat menginduksi produksi bakteriosin).

Tabel 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas bakteriosin  
 Table 4. Effect of temperature on bacteriocin activity

Perlakuan/Treatment	Aktivitas Bakteriosin/Bacteriocin Activity
Kontrol/Control	+
50 °C selama 20 menit/50 °C for 20 minutes	+
100 °C selama 20 menit/100 °C for 20 minutes	+
121 °C selama 15 menit/121 °C for 15 minutes	+

Keterangan/Note: Kontrol adalah larutan bakteriosin tanpa diberi perlakuan/  
 Control was bacteriocin solution without treatment

Tween diperlakukan juga untuk meningkatkan aktivitas supernatan. Namun, efeknya bergantung jenis bakterinya (Reese & Maguire, 1969 dalam Castro, 2011). Peningkatan ini mungkin disebabkan karena pengaruh surfaktan terhadap permeabilitas membran sel (Ogunbanwo et al. 2003).

**Stabilitas bakteriosin selama penyimpanan**

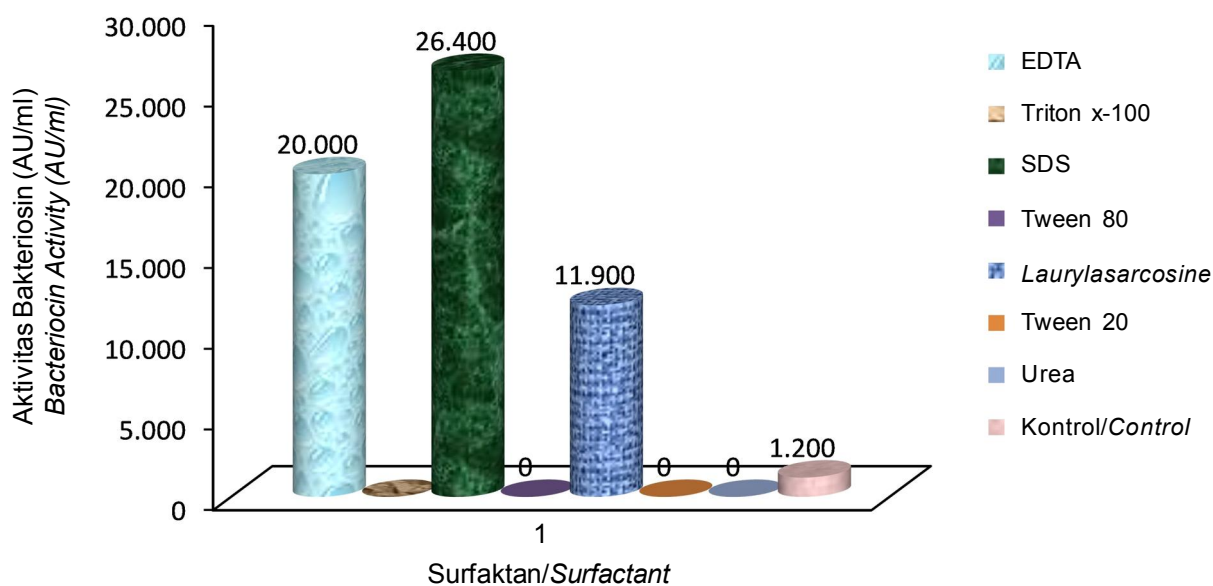
Uji stabilitas bakteriosin dilakukan melalui penyimpanan bakteriosin pada suhu -20, 4, dan 37 °C selama 4 minggu (Tabel 5). Bakteriosin yang dihasilkan oleh RK4 bersifat lebih stabil setelah penyimpanan selama 4 minggu pada suhu 37°C dan 4 °C, namun tidak terdeteksi setelah penyimpanan pada suhu -20°C. Hal ini mengindikasikan bahwa penyimpanan bakteriosin tersebut hingga suhu 4°C mungkin merupakan teknik preservatif yang sesuai. Aktivitas serupa ditunjukkan oleh pentocin 31-1 yang dihasilkan oleh produk daging asal china Xuan-Wei

Ham (Liu et al., 2008). Selain itu berdasarkan aktivitas anti *Stahylococcus* yang ditunjukkan oleh bakteriosin RK4 dan sifatnya yang relatif lebih stabil pada suhu ruang dan suhu dingin, menunjukkan bahwa bakteriosin tersebut potensial digunakan sebagai pengawet pangan, khususnya pada produk pangan yang rentan terkontaminasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

Oleh karena itu, masih diperlukan riset yang berkaitan dengan aplikasi bakteriosin tersebut pada produk pangan terutama yang disimpan pada suhu ruang dan suhu dingin.

**Identifikasi isolat RK4**

Metode untuk mengidentifikasi mikroorganisme manual ke tingkat spesies dapat menggunakan produk identifikasi bioMérieux API yaitu test kit untuk identifikasi bakteri Gram positif, Gram negatif, dan ragi.



Gambar 2. Pengaruh surfaktan terhadap aktivitas bakteriosin.  
 Figure 2. Effect of surfactant on bacteriocin activity.



Tabel 5. Stabilitas bakteriosin  
Table 5. Stability of bacteriocin

Suhu Penyimpanan/ Storage Temperature	Aktivitas Bakteriosin/Bacteriocin Activity			
	Minggu ke-1/ 1st week	Minggu ke-2/ 2nd week	Minggu ke-3/ 3rd week	Minggu ke-4/ 4th week
37 °C	+	+	+	+
4 °C	+	+	-	-
-20 °C	-	-	-	-

Berdasarkan karakteristik fisiologis dan biokimia dengan menggunakan test kit API 50 CH dan API 50 CHL medium versi 5.1 (biomerieux) yang dilanjutkan dengan pengolahan dan analisis menggunakan software APIWEB, maka strain bakteriosin yang diisolasi dari isolat BAL tersebut teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* 1 dengan kategori indikasi baik (99,7%). Strain RK4 merupakan Gram positif, berbentuk coccus, katalase negatif dan oksidase negatif. Strain RK4 mampu memfermentasi gula seperti ribosa, galaktosa, glukosa, fruktosa, manosa, selobiosa, maltosa, laktosa, sakarosa, trehalosa dan gentobiose. Karakteristik fisiologi dan biokimia isolat RK4 dapat dilihat pada Tabel 6.

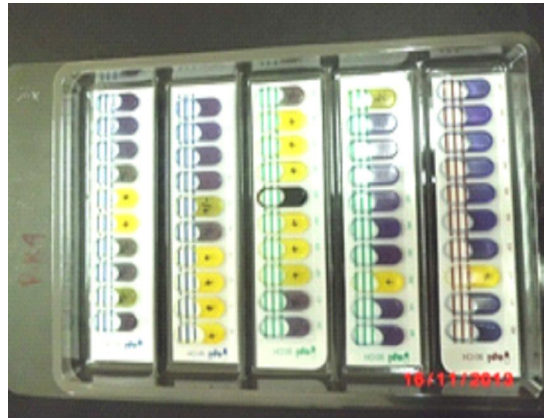
Hasil tes kit API 50 CHL dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil positif (+) ditandai dengan perubahan warna dari biru menjadi kuning setelah diinkubasi selama 48 jam, sedangkan yang memiliki hasil negatif (-) tidak mengalami perubahan warna (tetap berwarna biru).

### KESIMPULAN DAN SARAN

Dari sampel rusip yang berasal dari Bangka dan Kalimantan telah diperoleh 12 isolat BAL. Selanjutnya dari kedua belas isolat BAL tersebut diperoleh 1 isolat BAL (RK4) asal Kalimantan yang mampu menghasilkan bakteriosin. Isolat RK4 yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* 1

Tabel 6. Karakteristik fisiologis dan biokimia isolat RK4  
Table 6. Physiological and biochemical characteristics of isolate RK4

Karakteristik Fisiologi dan Biokimia/ Physiological and Biochemical Characteristics	Hasil/Results
Morfologi koloni/Colony morphology	Putih, koloni bulat halus/ White, smooth round colonies
Pewarnaan Gram/Gram staining	Gram positif, coccus/Gram positive, coccus
Pertumbuhan di MRS broth/Growth in MRS broth	Keruh/Turbid
Fermentasi positif/ Fermentation positive to	L-Arabinosa, Ribosa, Galaktosa, D-Glukosa, D-Fruktosa, D-Mannosa, N-Asetilglukosamin, Amigdalina, Arbutin, Salisin, Selobiosa, Maltosa, Trehalosa, D-Tagatosa/ L-Arabinose, Ribose, Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetylglucosamine, Amygdalin, Arbutin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Trehalose, D-Tagatose
Uji katalase/Catalase test	Negatif/Negative
Uji oksidase/Oxidase test	Negatif/Negative
Identifikasi/Identification	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1
% ID	99.7%



Gambar 3. Hasil identifikasi isolat RK4 setelah 48 jam pasca inokulasi pada Tes Kit API 50 CHL. Reaksi positif ditunjukkan warna kuning.

Figure 3. Identification result of isolat RK4 after inoculation for 48h using API 50 CHL. Positive reaction was shown by yellow colour.

menghasilkan bakteriosin yang bersifat sensitif terhadap enzim proteolitik proteinase-K dan papain. Bakteriosin yang dihasilkan bersifat stabil hingga mencapai suhu 121 °C, stabil pada pH 2-8, memiliki spektrum penghambatan sempit hanya terhadap *Staphylococcus aureus* dan aktivitasnya distimulasi oleh surfaktan SDS, laurylsarcosine dan EDTA. Sebaliknya Tween 20, Tween 80, Triton X-100 dan urea justru menghambat aktivitasnya. Bakteriosin kasar RK4 stabil pada penyimpanan suhu 37 °C selama 4 minggu dan pada suhu dingin selama 2 minggu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abrams, D., Barbosa, J., Albano, H., Silva, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from "Alheira". *Food Control*. 22: 940–946.
- Alegria, A., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 143(1–2): 6–61.
- Altuntas, E.G., Cosansu, S., & Ayhan, K. (2010). Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *International Journal of Food Microbiology*. 141: 28–31.
- Avonts, L., Van Uytven, E., & De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal* 14: 947–955.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria : Classification and Physiology. In Salminen, S., Wright, A.V., and Ouwehand. (eds). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Fungtional Aspects Third Edition*. Revised and Expanded : 1–66.
- Biscola, V., Todorov, S.D., Capuano, V.S.C., Abriouel, H., Galvez, A., & Franco, B.D.G.M. (2013). Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from *charqui*, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*. 93: 607–613.
- Barbosa, M.S., Todorov, S.D., & Jurkiewicz, C.H. (2015). Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBsa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 47: 147–153.
- Con, A.H. & GoE kalp, H.Y. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*. 55: 89–96.
- Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., & Campos, C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*. 87: 321–329.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 21 (1): 53–58.
- De Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazolla, P.G., & Penna, T.C.V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trend in Food Science & Technology*. 20: 146–154.
- De Martinis, E.C.P., & Freitas, F.Z. (2003). Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 14(3): 197–200.
- De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.
- De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria : production, purification, and food

- applications. *J. Mol Microbiol Biotechnol.* 13: 194–199.
- Delgado, A., Francisco No'e Arroyo L'opez, F. N.A., Brito, D., Peres, C., Fevreiro, P., & Garrido-Fern'andez, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology.* 130: 193–201.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L. & Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 120: 51–70.
- Gao, Y., Jia, S., Gao, Q., & Zhilei. (2010). A novel bacteriocin with broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Food Control.* 21: 76–81.
- Hata, T., Tanaka, R., & Ohmomo, A. (2010). Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International Journal of Food Microbiology.* 137: 94–99.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2011). Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiology.* 28(8): 1514–8.
- Kaewkloma, S., Lumlert, S., Kraikul, W., & Aunpada, R. (2013). Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi). *Food Control.* 32: 552–557.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337–349.
- Kusmarwati A. & Indriati, N. (2012). Karakteristik bakteri asam laktat asal rusip sebagai agen probiotik. *Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.* 7(2): 159–170.
- Kusmiati & Malik, A. (2002). Bacteriocin activity of *Leuconostoc mesenteroides* Pbac1 bacteria on several media. *Makara, Health.* 6(1): 1–7.
- Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K. & Zhang, J. (2008). Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control.* 19: 353–359.
- Mandal, V., Sen, S.K. & Mandal, N.C. (2008). Optimized cultured conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB and its characterization. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 45: 106–110.
- Nugroho, D.A. & Rahayu, E.S. (2003). Extraction and characterization of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* SM 22. *J. Technol and Food Industry.* 14(3).
- Omar, N. B., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J. & Galvez, A. (2006). Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology.* 112: 44–50.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. & Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology.* 2(8): 219–227.
- Osmanagaoglu, O., Gunduz, U., Beyatli, Y., & Cokmus, C. (1998). Purification and characterization of Pediocin F.A bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. Tr. *J. of Biology.* 22: 217–228.
- Rahayu, E.S. & Margino, S. (1997). *Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi.* Materi Workshop, PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Rahayu, E.S., Ekasari, A., Wardhani, A.K., & Margino, S. (1999). *Screening of Lactic Acid Bacteria from Meat and Meat Product as Bacteriocin Producer.* Proceeding of Food National Conference, Yogyakarta.
- Rahayu, E.S., Wardani, A.K., & Margino, S. (2004). Skrining bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dari daging dan produk olahannya. *Agritech.* 24(2): 74–81.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology.* 2(2): 138–144.
- Ray, B. (1992). *Fundamental Food Microbiology.* CRC Press. London. 516 p.
- Sakti, T.P.J. (2009). *Analysis Probiotic of Lactic Acid Bacteria from Rusip.* Schript. Departement of Agriculture Sriwijaya University. 35 pp.
- Syahniar, T.M. (2009). *Production and Characterization of Bacteriosin from Lactobacillus plantarum 1A5 and Antimicrobial Activity to Pathogen Bacteria.* Schript. IPB Bogor. 61 pp.
- Todorov, S.D. & Dicks. (2005). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technol Biotechnol.* 43: 165–173.
- Todorov, S.D. & Dicks, L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry.* 41: 11–19.
- Todorov, S.D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G., & Franco, B.DGM. (2011a). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)-from isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International.* 44: 1351–1363.
- Todorov, S.D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, Leon MT., Van Reenen., Pre'vost, H., & Dousset, X. (2011b). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe.* 17: 23–31.
- Udhayashree, N., Senbagam, D., & Senthilkumar, B. (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* S406–S410.

- Usmiati, S. & Marwati, T. (2007). Selection and optimization of process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. *J. Post Harvest.* 4(1): 27–37.
- Yuliana, N. (2007). Profile of rusip fermentation made from anchovies (*Stolephorus* sp). *Agritech.* 27(1): 12–17.