

Metode Alternatif Penyimpanan Udang Segar dengan Nisin dari *Lactococcus lactis* sebagai Pengawet Alami

Dyah Fitri Kusharyati dan P. Maria Hendrati

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

Abstract

Nisin is a Lactococcus lactis metabolite, one of natural preservatives against microbes. The antimicrobial inhibition is influenced by its concentration and contact time with the targeted microbes. The aim of the study was to know the concentration of L. lactis extract and optimal time of soaking the growing shrimp bacterial in refrigerator temperature for nine days. This study was conducted experimentally applying factorial design. The first factor was soaking duration, i.e. 0 minute (P_0), 30 minutes (P_1), 60 minutes (P_2), and 90 minutes (P_3), while the second factor was concentration levels of metabolite of L. lactis extract. The results showed that the metabolite has an inhibitory effect on shrimp bacterial in dosed dependent way. The best performance of inhibition was detected at 60 minute-soaking duration.

Keywords: antimicrobe, Lactococcus.lactis, nisin

Pendahuluan

Udang merupakan komoditas ekspor utama dari sektor perikanan dan diketahui sebagai salah satu bahan pangan yang cepat membusuk karena termasuk bahan pangan berprotein dan berkadar air tinggi. Penurunan mutu udang dapat terjadi setelah penangkapan dan dapat disebabkan oleh kontaminasi bakteri selama penanganan bahan baku, pengolahan hingga pemasaran. Oleh karena itu, perlu penanganan yang tepat, antara lain dengan cara pengawetan. Salah satu prinsip pengawetan pangan yang dapat diterapkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada bahan pangan adalah dengan penambahan zat antimikroba (Fardiaz, 1992).

Senyawa antimikroba yang dihasilkan *Lactococcus lactis* dikenal dengan nama nisin. Senyawa ini merupakan satu-satunya bakteriosin yang diizinkan penggunaannya oleh WHO sebagai pengawet dalam bahan makanan Nisin dalam bentuk kering stabil selama beberapa tahun, sedangkan dalam bentuk larutan kestabilannya dapat diperbaiki dengan menaikkan pH. Nisin mempunyai aktivitas maksimum pada pH 6,5 dan sensitif khususnya terhadap enzim proteolitik seperti tripsin, pankreatin, enzim *salivary* dan enzim pencernaan kecuali renin (Luck dan Jagger, 1997). Selain itu, nisin sebagai bahan pengawet alami stabil terhadap pemanasan serta suhu penyimpanan yang rendah, tidak menimbulkan rasa dan bau yang tidak enak serta tidak menimbulkan kerusakan nutrisi pada makanan, tidak toksik dan tidak mempengaruhi keberadaan flora normal dalam saluran pencernaan (Tian, 2003 *dalam* Li dan Hong, 2005).

Kusnadi (1999) membedakan istilah bakteriosin dan antibiotik berdasarkan atas proses sintesisnya. Sintesis antibiotik umumnya terjadi pada fase stasioner, sedangkan bakteriosin disintesis pada akhir fase logaritmik. Nisin digolongkan ke dalam bakteriosin karena disintesis pada akhir fase logaritmik

Nisin adalah antimikroba tipe polipeptida yang sintesisnya dipengaruhi oleh ribosom, tetapi biosintesisnya belum diketahui secara pasti (Ray dan Daeschel,1992; Agustin, 1999). Kerja senyawa antimikroba seperti nisin dipengaruhi oleh konsentrasi, waktu kontak, serta jumlah dan jenis bakteri. Pada konsentrasi yang tinggi suatu

antimikroba yang semula hanya bersifat bakteriostatik dapat menjadi bersifat bakterisidal (Volk dan Wheeler, 1988)

Dengan mempertimbangkan hal tersebut di atas, perlu dilakukan penelitian tentang cara penyimpanan udang dengan nisin sebagai pengawet alami. Produk nisin dengan metode bertingkat dan lama kontak perendaman udang pada ekstrak metabolit ini diharapkan mampu mengatasi masalah kesegaran udang selama penyimpanan. Dengan demikian, proses kerusakan udang akibat autolisis, oksidasi, ataupun kontaminasi oleh mikroba dapat dikurangi.

Materi Dan Metode

Penelitian dilaksanakan secara eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial.

Peremajaan isolat *L. lactis* FNCC0086 dilakukan dari kultur kering yang ditumbuhkan dalam 5 ml media MRS Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, kultur cair ini dipindahkan ke media MRS-agar tegak dengan cara tusukan tegak, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Persiapan kultur *L. lactis* FNCC0086 (Shimizu *et al.*, 1999) dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu kultur pembenihan (*seed culture*) dengan *L. lactis* sebanyak 50 µl yang diinokulasikan ke dalam 10 ml medium kultur pembenihan dan diinkubasi statis pada suhu 30°C selama 6 jam; prakultur (*pre-culture*) menggunakan 100µl *L. lactis* FNCC0086 dari kultur pembenihan yang diinokulasikan ke dalam 100 ml medium prakultur dan selanjutnya diinkubasi statis pada suhu 30°C selama 10 jam; kultur primer (*primary culture*) dengan *L. lactis* FNCC0086 sebanyak 100µl dari prakultur yang diinokulasikan ke dalam 100 ml medium kultur primer dan diinkubasi statis pada suhu 30°C selama 10 jam.

Produksi metabolit *L. lactis* FNCC0086 (Shimizu *et al.*, 1999) didapatkan dari media kultur primer yang diinokulasikan ke dalam 100 ml medium produksi metabolit *L. lactis*. Inkubasi dilakukan pada inkubator statis suhu 30°C selama 11 jam. Medium produksi dipertahankan pada pH 6 dengan penambahan NaOH 0,1 N.

Pemanenan metabolit *L. lactis* FNCC0086 (Shimizu *et al.*, 1999) dilakukan setelah 11 jam inkubasi pada medium produksi dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 10.000 xg selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipekatkan menggunakan *freeze drier*. Ekstrak metabolit inilah yang disebut dengan nisin.

Pembuatan larutan metabolit *L. lactis* FNCC0086 (Shimizu *et al.*, 1999) dilakukan sebagai berikut. Nisin dilarutkan dalam 10 ml HCl 0,02N yang mengandung 0,75% NaCl (Chung *et al.*, 1989) pada pH 6. Larutan ekstrak dibuat dengan variasi konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20% dan disterilisasi menggunakan *membrane filter*.

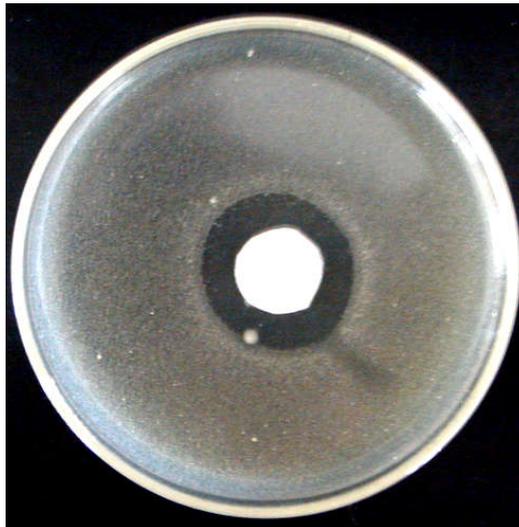
Aplikasi ekstrak metabolit *L. lactis* secara *in vitro* terhadap bakteri udang dilakukan sebagai berikut. Satu ose isolat bakteri udang diinokulasikan ke dalam medium NB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Suspensi diambil 1 ml kemudian diinokulasi ke medium NA steril pada cawan petri secara penaburan (*spread plating*). Kertas cakram steril berdiameter 13 mm dicelupkan ke dalam larutan ekstrak metabolit. Kertas cakram selanjutnya diletakkan di tengah medium NA yang telah diinokulasikan dengan bakteri udang. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 48 jam dan diamati diameter zona jernih yang terbentuk.

Aplikasi ekstrak metabolit *L. lactis* secara *in vivo* terhadap bakteri udang pada udang segar dilakukan sebagai berikut. Udang segar disimpan dalam kontainer bersuhu rendah 0°C dan segera dibawa ke laboratorium untuk diberi perlakuan. Udang dicelupkan ke dalam larutan ekstrak metabolit *L. lactis*, masing-masing dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20%. Lama perendaman masing-masing konsentrasi adalah 0, 30, 60, dan 90 menit. Udang setelah direndam dalam larutan tersebut ditiriskan dan disimpan dalam refrigerator selama 9 hari. Pada hari ke-0, bakteri pada udang didapatkan dengan memaserasi udang dan dibuat suspensi pada pengenceran 10⁻² dan 10⁻³. Selanjutnya, dilakukan inokulasi secara *spread plating* pada medium NA. Kultur diinkubasi pada suhu

30 °C selama 2 hari dan jumlah koloni bakteri dihitung dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji ekstrak metabolit *L. lactis* terhadap bakteri udang secara *in vitro* menggunakan kertas cakram yang dicelupkan ke dalam ekstrak metabolit *L.lactis* menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri udang dapat dihambat. Hal ini ditunjukkan oleh adanya zona jernih seperti terlihat pada Gambar 1. Zona jernih di sekitar kertas cakram terbentuk karena ekstrak metabolit bersifat *single hit inactivation*, yang berarti bahwa satu molekul ekstrak akan membunuh satu sel bakteri udang dan besarnya zona jernih bergantung kepada kecepatan difusi antimikroba dan kecepatan pertumbuhan sel bakteri (Davidson dan Parish, 1989).



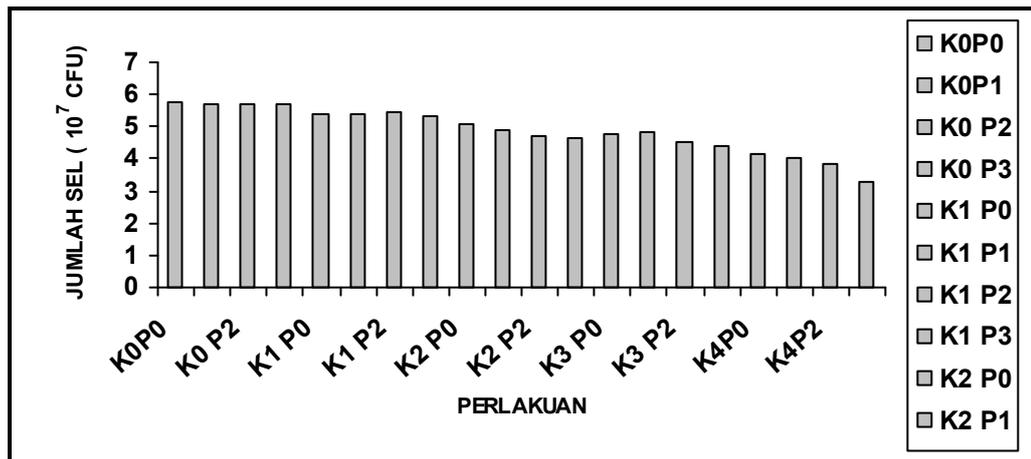
Gambar1. Zona hambat pertumbuhan bakteri udang dengan perlakuan ekstrak kasar metabolit *L. lactis*

Figure 1. Inhibition zone of shrimp bacterial growth on media with gross extract of *L.lactis* metabolite

Ekstrak metabolit yang digunakan diduga mengandung bakteriosin sehingga dapat menghambat bakteri pada udang, dan terjadinya penghambatan dimungkinkan karena adanya lapisan lemak pada dinding sel bakteri dari ekstrak metabolit *L.lactis*. Mekanisme penghambatan diduga karena dinding sel bakteri bersifat permeabel terhadap ekstrak metabolit tersebut sehingga ekstrak metabolit tersebut bergerak bebas melewati dinding sel dan mengalami kontak dengan membran sitoplasma.

Pengaruh ekstrak metabolit terhadap bakteri yang berasal dari udang menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak metabolit *L. lactis* dan lama perendaman memberikan pengaruh terhadap penurunan jumlah sel bakteri udang. Makin tinggi konsentrasi ekstrak metabolit dan makin lama waktu perendaman, makin menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan sel sehingga terjadi penurunan jumlah sel dari $5,75 \times 10^7$ sel (P0K0) menjadi $3,30 \times 10^7$ sel (P3K4) seperti terlihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi nisin yang dicobakan, makin menurun jumlah bakteri dari udang. Hal ini sesuai dengan pendapat Li dan Hong (2005) bahwa pengaruh penghambatan nisin akan makin meningkat sejalan dengan makin tingginya konsentrasi nisin. Selain itu, dikatakan bahwa kerja senyawa antimikroba seperti nisin dipengaruhi oleh konsentrasi, waktu kontak, serta jumlah dan jenis bakteri. Pada konsentrasi yang tinggi suatu mikroba yang semula bakteristatik dapat menjadi bakterisidal (Volk dan Wheeler, 1989). Efektivitas kerja nisin dipengaruhi oleh cara penyimpanan antimikroba (Ray dan Daeschel, 1992).



Gambar 2. Jumlah sel bakteri udang pada media dengan perlakuan konsentrasi nisin/ekstrak kasar metabolit *L. lactis* 0% (K₀), 5% (K₁), 10% (K₂), 15% (K₃), 20% (K₄), serta lama perendaman 0 menit (P₀), 30 menit (P₁), 60 menit (P₂), 90 menit (P₃).

Figure 2. Number of shrimp bacterial cells on media with *L. lactis* metabolite extract at concentrations of 0% (K₀), 5% (K₁), 10% (K₂), 15% (K₃), 20% (K₄), and soaking periods of 0 minute (P₀), 30 minutes (P₁), 60 minutes (P₂), 90 minutes (P₃).

Terjadinya penghambatan pertumbuhan bakteri diduga karena adanya lapisan lemak pada dinding sel bakteri yang terdapat pada udang yang berperan sebagai reseptor masuknya ekstrak metabolit *L. lactis* ke dalam sel bakteri. Bakteriosin yang bersifat kationik akan teradsorpsi pada molekul ionik yang terdapat di permukaan sel (lapisan lemak). Hal ini menyebabkan perubahan khusus pada dinding sel. Perubahan ini memungkinkan masuknya bakteriosin melewati dinding sel, mengadakan kontak dengan membran sitoplasma, dan menimbulkan efek bakterisidal. De Vuyst dan Vandamme (1991) dalam Kim (1997) memperjelas bahwa target utama bakteriosin adalah membran sitoplasma karena reaksi awal bakteriosin adalah merusak permeabilitas membran sehingga menghambat produksi energi dan biosintesis protein.

Perlakuan perendaman dalam ekstrak *L. lactis* dengan perlakuan perendaman selama 60 menit mulai menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri yang cukup efektif, yang dapat dilihat dari penurunan jumlah bakteri. Dengan demikian, lama perendaman yang baik adalah dimulai dari 60 menit.

Kesimpulan

Makin tinggi konsentrasi ekstrak metabolit *L. lactis*, makin menghambat pertumbuhan bakteri dari udang dan lama perendaman mulai 60 menit merupakan perendaman yang efektif. Agar penghambatan lebih optimal perlu dilakukan tambahan perlakuan pendinginan pada suhu 0°C terhadap udang segera setelah pemanenan..

Daftar Pustaka

- Agustin, K. W. 1999. Purifikasi dan Karakterisasi Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat. Tesis. Program Pascasarjana, UGM. Yogyakarta
- Chung, K., J.S. Dikson and J.D. Crouse. 1989. Effect of nisin on growth on bacteria attached to meat. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 55 (6): 1329–1333.
- Davidson, P.M. and M.E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Journal Food Technology* 1: 148-155

- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Kusnadi, J. 1999. Produksi dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriosin Isolat *Pediococcus* sp.24 serta Identifikasinya. Tesis (tidak dipublikasikan). Program Pascasarjana Universitas GajahMada, Jogjakarta.
- Kim, W.S. 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Letters in Applied Microbiology* 25: 169-171
- Li , T., J. Tao and F. Hong. 2005. Study on the inhibition effect of Nisin. *The journal of American Science* 1 (2): 33-37
- Luck, E and M. Jagger. 1997. Antimicrobial Food Additives: Characteristic, Use and Effects. Springer, London, UK.
- Ray, B. and M. Daeschel. 1992. Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Shimizu, H.; Mizuguchi, T.; Tanaka, F. and Shioya, S..1999. Nisin production by mixed culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kyuveromces marxianus*. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 3134-3141.
- Volk , W.A. dan M.F. Wheeler. 1988. Mikrobiologi Dasar Jilid 1. Erlangga, Jakarta