ISOLASI DAN KARAKTERISASI SUBSTANSI ANTIMIKROBA
YANG DIHASILKAN OLEH BAKTERI YANG DIISOLASI
DARI SUSU SAPI MASTITIS

OLEH:
I NYOMAN SUARSANA

PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2000
RINGKASAN

I NYOMAN SUARSANA. Isolasi dan karakterisasi substansi antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari susu sapi mastitis, dibawah bimbingan Fachriyan Hasmi Pasaribu sebagai ketua, I Wayan Teguh Wibawan dan Maria Bintang sebagai anggota.

Mikroorganisme adalah penyumbang terbesar dalam menghasilkan senyawa antimikroba dibandingkan dengan organisme lain seperti hewan dan tumbuhan. Dalam usaha mencari penghasil antimikroba perlu dilakukan program skrining dengan mengeksploitasi dunia mikroba, mencari galur yang beragam dari habitat yang beragam disamping seleksi galur dengan harapan akan ditemukan isolat baru dan aktivitas yang lebih baik.

Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan identifikasi bakteri dari susu sapi mastitis guna memperoleh strain penghasil substansi antimikroba, isolasi, pemurnian dan karakterisasi sifat-sifat fisikokimia senyawa antimikroba dan aktivitas antibakterialnya terhadap bakteri patogen Gram negatif dan positif.

Dalam usaha mencari bakteri penghasil senyawa antimikroba dilakukan metode skrining yang meliputi pengujian invitro kemampuan isolat pada medium padat (media agar darah) menggunakan metode stab inocula. Pada skrining tahap kedua dilakukan produksi senyawa aktif antimikroba dengan fermentasi pada berbagai media cair dan juga pada media padat serta menguji aktivitas antibakterialnya secara invitro. Pada skrining tahap ketiga, dilakukan pemurnian dengan cara presipitasi menggunakan ammonium sulfat, kromatografi kolom penukar ion (DEAE selulosa) dan penentuan BM dengan SDS-PAGE serta karakterisasi senyawa antimikorba meliputi uji kimia (Ninhidrin, Molisch, Lowry), penentuan pH optimum, pengaruh suhu dan lama pemanasan serta pengaruh ensim terhadap aktivitas antibakterialnya.
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa bakteri yang berhasil diisolasi dari susu sapi mastitis mempunyai potensi yang bervariasi sebagai penghasil antimikroba. Diantara bakteri yang telah diisolasi dan paling potensial sebagai sumber penghasil senyawa antimikroba yang diekskresi secara ekstraseluler telah diidentifikasi sebagai *Lactococcus plantarum*.

Senyawa ekstraseluler *Lactococcus plantarum* mempunyai aktivitas spektrum antimikrobial sempit yaitu menghambat *Micrococcus varians*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Gram positif) dan *E. coli* (Gram negatif).

Selama pertumbuhan bakteri *Lactococcus plantarum*, senyawa antimikroba ini mulai dihasilkan dan mampu menghambat bakteri penguji setelah delapan jam inkubasi (fase eksponensial) dan produksi optimum dihasilkan pada hari ke lima inkubasi serta mempunyai aktivitas optimum pada pH 6. Senyawa antimikroba bersifat bakterisidal, thermostabil pada pH rendah (3-5) sampai pada pemanasan 121°C 15 menit, masih aktif pada kisaran pH 3-10. Selain itu aktivitas antimikroba yang diberi perlakuan dengan beberapa ensim proteolitik (papain, protease, bromelin dan ekstrak pankreas) aktivitas antimikroba berkurang (sensitif) sedangkan dengan ensim amyloglukosidase aktivitas antimikroba tetap. Dari hasil fraksinasi dengan kromatografi penukar ion (DEAE selulosa) serta dari uji ikatan peptida dengan metode Ninhidrin, Lowry dan pengaruh aktivitas dengan ensim proteolitik diperoleh bahwa senyawa antimikroba ini merupakan peptida dengan BM diperkirakan 10.900 Da yang selanjutnya dinyatakan sebagai bakteriosin.
SUMMARY

I NYOMAN SUARSANA. Isolation and Characterization of Antimicrobial Substance Produced by Bacteria Isolated from Mastitis of dairy Cows. (Under supervision of advisory committee of FACHRIYAN HASMI PASARIBU, as chairman and I WAYAN TEGUH WIBAWAN and MARIA BINTANG, as members).

Microorganism is the largest antimicrobial producer compared to other organisms such as animal and plant. In attempt to isolate antimicrobial-producing microorganism, it is essential to conduct screening program by exploiting the microbial world to search for new species from various types of habitate in order to obtain new isolates with new activities.

The present study is aimed to isolate and identify bacteria of mastitis of dairy cows in order to find antimicrobial-producing strains, isolate, purify and characterize the physicochemical and determine their antibacterial activities against Gram negative and positive pathogenic bacteria.

In attempt to find antimicrobial producing-bacteria screening program was carried out. The program included in vitro test to determine the efficacy of the isolates on solid media (blood agar media) using stab inocula method. In the second stage of the screening, production of the active antimicrobial substances was conducted in a liquid and a solid culture fermentation process followed by determination of the antimicrobial activity in vitro. In the third stage of screening, purification processes were done using several methods such as precipitation by ammonium sulfate, ion exchange chromatography (DEAE selulose), and determination of molecular weight using SDS-PAGE and characterization of the antimicrobial agent using chemical test (Ninhydrin, Molisch, Lowry), determination of optimum pH, effects of temperature and heating time and determination of effects of enzyme on antimicrobial activity.
These results showed that, bacteriocin which was produced by *Lactococcus plantarum* exhibited a narrow antimicrobial spectrum, inhibiting *Micrococcus varians*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *E. coli*. The production of bacteriocin during the growth of bacteria showed that it was continuously produced after 8 hours of cultivation (phase logarithmic), but highest production was observed at 5 days of incubation and it had activity optimum at pH 6. The bacteriocin was remained active over a pH range of 3 to 10 and not destroyed at low pH range 3-4 when heated at 121°C for 15 min and was sensitive to proteolytic enzymes (protease, papain, bromelin and extract pancreas) but insensitive to amyloglucosidase. Direct detection of antimicrobial activity on SDS-PAGE suggested an apparent molecular weight of about 10,900 Da.
ISOLASI DAN KARAKTERISASI SUBSTANSI ANTIMIKROBA YANG
DIHASILKAN OLEH BAKTERI YANG DIISOLASI
DARI SUSU SAPI MASTITIS

OLEH:
I NYOMAN SUARSANA

Tesis
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Magister Sains
pada Progam Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2000
Judul : ISOLASI DAN KARAKTERISASI SUBSTANSI ANTIMIKROBA YANG DIHASILKAN OLEH BAKTERI YANG DIISOLASI DARI SUSU SAPI MASTITIS.
Nama : INYOMAN SUARSANA
NRP : 98290
Program Studi : SAINS VETERINER

Menyetujui
1. Komisi Pembimbing
   
   [Signature]
   Dr. drh, Fachriyan Hasmi Pasaribu
   Ketua

   [Signature]
   Dr. drh, I Wayan Teguh Wibawan, MS.
   Anggota
   Prof. Dr. drh, Maria Bintang, MS
   Anggota

2. Ketua Program Studi
   Sains Veteriner
   [Signature]
   Dr. drh, I Wayan Teguh Wibawan MS

3. Direktur Program Pascasarjana
   Institut Pertanian Bogor
   [Signature]
   Prof. Dr. Syafitida Manuwoto, MSc., PhD.

Tanggal Lulus : 22 Juni 2000
RIWAYAT HIDUP

1 NYOMAN SUARSANA dilahirkan di Jimbaran-Kuta-Denpasar-Bali, pada
tanggal 31 Juli 1965 sebagai anak ke dua dari lima bersaudara dari Ayah I Wayan
Dengklong (Alm) dan Ibu Ni Wayan Suweng. Penulis menyelesaikan pendidikan SD
tahun 1979 di SD I Jimbaran, SMP tahun 1982 di SMP Taman Sastra Jimbaran, dan

Pada tahun 1985 penulis mendapat kesempatan kuliah di Institut Pertanian Bogor
melalui jalur PMDK (Penelusuran Minat Dan Bakat) dan tahun 1989 memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan (Drs. Med. Vet.) pada Fakultas Kedokteran Hewan Institut
Pertanian Bogor. Pada tahun 1990 memperoleh gelar Dokter Hewan pada Fakultas yang
sama.

Selama mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia dari

Penulis pernah bekerja sebagai sales control pada sales departement Aerowisata
Catering Service Garuda Indonesia Group, Bandara Ngurah Rai Denpasar dari tahun 1992
sampai tahun 1994. Sejak tahun 1993 sampai sekarang penulis bekerja sebagai staf
pengajar di bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Denpasar.

Mulai tahun ajaran 1998/1999 penulis mendapat beasiswa dari Departemen
Pendidikan dan Kebudayaan melalui BPPS (Biaya Pendidikan Pascarjana) untuk
mengikuti Program Magister pada Program Studi Sains Veteriner, Program Pascasarjana
Institut Pertanian Bogor.

Pada tanggal 30 Maret 1993 Penulis menikah dengan Ir. Ni Made Hirayuni dan
dikaruniai seorang putra yaitu I Putu Prananta Andi Yunarsa (6 tahun)
KATA PENGANTAR


Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih kepada yang terhormat Dr. drh. Fachriyan Hasmi Pasaribu atas kesediaan beliau menjadi ketua komisi pembimbing dan Dr. drh I Wayan Teguh Wibawan, MS. serta Prof. Dr. drh. Maria Bintang, MS. atas kesediaan beliau menjadi anggota komisi pembimbing. Bimbingan beliau yang lugas, cermat dan terarah memberi tuntunan berpikir analisis yang sistematis kepada penulis. Selain itu penulis juga merasa banyak mendapat dorongan, saran dan bimbingan sehingga dukungan beliau-beliau sangat membantu cara berpikir penulis. Terimakasih pula atas kesediaan waktu yang diluangkan atas segala diskusi-diskusinya baik secara formal, atau disetiap ada kesempatan dimana saja dipelbagai tempat atau melalui telpon.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dra. Tami Idenyanti, MSc. Kepala Laboratorium Pengelolahan limbah Industri P3KT-LIPI, PUSPITEK Serpong atas kesediaan membantu penyediaan fasilitas penelitian yang sangat memperlancar penelitian ini.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Bapak Rektor Universitas Udayana, Bapak Dekan Fakultas kedokteran Hewan Universitas Udayana atas ijin untuk mengikuti program Magister (S2) di Institut Pertanian Bogor. Terima kasih pula kepada Bapak Rektor Institut pertanian Bogor, Direktur Program Pascasarjana – IPB dan
pengelola BPPS (Biaya Pendidikan Pascasarjana) Departemen pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas kesempatan dan dukungan biaya yang telah diberikan sehingga proses penyelesaian studi penulis dapat berjalan lancar.

Terima kasih juga kepada Ketua Program Studi Sains Veteriner beserta staff pengajar, juga kepada kepala Laboratorium Bakteriologi, Bapak Drh. Eko Sugeng Pribadi, MS beserta laboran Bapak Agus Somantri, SPd, Agus Setia Nugraha, Rafiq dan Elan yang telah memberi suasana kondusif dan ikut membantu selama penulis melakukan penelitian.

Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada kepala Lab. Biokima-FMIPA-IPB dan Bapak Ir. I Made Artika, MSc, PhD atas segala diskusi-diskusi kecil dan penelusuran pustaka melalui internet, Bapak Wakiman, Ibu Iis dan Ibu Meri atas bantuan dalam melaksanakan penelitian.

Tidak lupa juga melalui kesempatan ini penulis sampaikan terimakasih yang tulus kepada drh. A.E.T.H. Wahyuni, MSi., drh Sri Estuningsih, MSi, Bapak drh. Mahdi, MSc. Atas kerelaannya memberikan kesempatan menggunakan sampel susu sapi mastitis sebagai bahan penelitian
