

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam laktat (BAL) yaitu kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat, selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, 2004).

Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa termasuk didalam kelompok bakteri asam laktat bersifat homofermentatif, sedangkan Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbon dioksida dikenal dalam kelompok Bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif (Reddy *et al.*, 2008).

Bakteri Asam Laktat menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri patogen (Usmiati, 2012).

Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin dan mempunyai aktivitas hambat besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* terdapat di dalam saluran pencernaan (Usmiati, 2012).

**Ada 2 kelompok BAL (Prescott et al., 2002) yaitu :**

1. Bakteri homofermentatif yaitu glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh : *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.
2. Bakteri heterofermentatif yaitu glukosa difermentasikan menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO<sub>2</sub>

## **B. Antibakteri**

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme). Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas zat antibakteri adalah pH, suhu stabilitas senyawa, jumlah bakteri yang ada, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolisme bakteri. Antimikroba meliputi golongan antibakteri, antimikotik, dan antiviral (Nilsson, 2000).

Bakteri Asam Laktat menghasilkan senyawa bersifat antibakteri yaitu bakteriosin yang mampu membunuh atau menghambat bakteri patogen. Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin yaitu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* mempunyai aktivitas hambat yang besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen.

Secara umum bakteriosin memenuhi syarat sebagai agen biopreservatif. Produksi bakteriosin memiliki kondisi – kondisi tertentu yaitu pH 6 – 7 merupakan derajat keasaman optimal untuk produksi bakteriosin (Gautam dan Sharma, 2009).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri dapat berupa yaitu antara lain (1) kerusakan dinding sel bakteri yang menyebabkan lisis atau penghambatan terbentuknya dinding sel pada sel yang tumbuh (2) perubahan permeabilitas membran sitoplasma yang diakibatkan oleh senyawa fenol (3) denaturasi sel (4) penghambatan kerja enzim di dalam sel (Gautam dan Sharma, 2009).

## **C. Produksi Antibakteri**

### **1. Sintesis asam laktat**

Senyawa organik berupa asam laktat dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat. Proses fermentasi asam laktat dimulai dari jalur glikolisis yang menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat yang terdegradasi akan mengalami degradasi molekul (secara anaerob) karena tidak tersedianya oksigen. Asam piruvat yang

terdegradasi dikatalisis oleh enzim asam dehidrogenase dan direduksi NADH untuk menghasilkan ATP dan asam laktat (Pelaez dan Orue 2010).

## 2. Sintesis hidrogen peroksida

Hidrogen peroksida disekresikan Bakteri Asam Laktat sebagai antibakteri yang mampu bersifat bakteriostatik maupun bakterisidal. Tahapan sintesis hidrogen peroksida dimulai dari sitokrom c oksidase, kompleks transpor elektron terminal pada rantai transpor elektron (sitokrom *aa3*). Zat ini mengkatalisis reduksi 4 elektron  $O_2$  menjadi  $H_2O$ .  $O_2$  terikat ke 2 ion logam paramagnetik di tempat aktif.  $O_2$  kemudian direduksi dalam suatu langkah 2 – elektron untuk menghasilkan peroksida, sehingga reduksi satu – elektron yang tidak menguntungkan dapat menyebabkan terbentuknya superoksida bebas dapat dihindari. Dua elektron tambahan menyebabkan reduksi zat antara oksigen reaktif, sehingga terbentuk 2 mol  $H_2O$  per mol  $O_2$  yang direduksi. Mekanisme ini memungkinkan reaksi cara yang sangat terkontrol tanpa adanya interaksi antara radikal bebas oksigen dan komponen mitokondria di dekatnya. Sebagian besar oksidase di dalam sel membentuk hidrogen peroksida  $H_2O_2$  dan bukan  $H_2O$  (Ouweland dan Vesterlund, 2004).

## 3. Sintesis bakteriosin

Bakteriosin tersusun dari senyawa protein sintesis bakteriosin oleh Bakteri Asam Laktat mengikuti pola sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstra kromosomal dan dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama pH. Bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal. Prinsip regulasi sintesis

bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas (Usmiati, 2012).

Ada 3 tahapan sintesis bakteriosin (Campbell et al, 2002) yaitu sebagai berikut :

DNA polymerase berperan sebagai enzim utama dalam replikasi. DNA polymerase mensintesis DNA baru dengan arah  $5 \rightarrow 3'$ . DNA polymerase tidak bisa membuat untai DNA baru tetapi hanya menambahkan nukleotida pada  $3'$ -OH yang sudah ada. Pembentukan untai baru memerlukan primer (RNA), yaitu tempat untuk DNA polymerase dapat menempelkan nukleotida yang pertama. Pembentukan untai DNA baru dimulai dari  $5' \rightarrow 3'$  akan terjadi sintesis DNA secara bersinambungan (Leading strand), sedangkan pada untai yang lainnya akan terjadi sintesis DNA terputus – putus (Lagging strand) karena untai DNA berpasangan secara anti – paralel. Replikasi dimulai pada yang disebut ori (Origin of replication) dan berakhir pada terminator.

1. Pada proses transkripsi terjadi sintesis mRNA (messenger RNA) dari DNA template oleh enzim RNA polymerase. RNA polymerase berikatan dengan bagian DNA template yang disebut promotor. RNA polymerase akan bergerak dengan arah  $5' \rightarrow 3'$ . Transkripsi yang akan dimulai disebut initiation site dan berakhir pada termination site.
2. Pada tahap translasi terjadi proses penerjemahan ''bahasa'' asam nukleat (mRNA) menjadi ''bahasa'' protein oleh ribosom dan tRNA. Ribosom dan tRNA akan berikatan pada start codon di mRNA. Pada stop codon terjadi elongasi dan berakhir. Satu segmen DNA yang mengkode suatu protein disebut opening reading frame (orf).

Faktor – faktor yang mempengaruhi produksi antibakteri yaitu sebagai berikut(Salminen *et al.*, 2004):

1. pH substrat

Bakteri Asam laktat mampu bertahan pada pH dibawah 4. pH substrat yang sesuai diperlukan untuk produksi antibakteri. Semakin rendah pH substrat maka banyak  $H^+$  yang terbebas ke dalam substrat dan menempel pada membran. Semakin tinggi pH substrat maka banyak  $OH^-$  yang terbebas ke dalam substrat dan menempel pada membran. Hal ini menyebabkan sisi aktif enzim berubah. Dengan demikian jika pH substrat tidak sesuai akan mengganggu permeabilitas membran dan menghambat produksi antibakteri. pH substrat yang sesuai akan menghasilkan banyak antibakteri secara maksimal

2. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi disesuaikan dengan pertumbuhan bakteri dalam memproduksi antibakteri. Bakteri Asam Laktat memerlukan waktu inkubasi optimum selama 48 jam atau 3 hari untuk memproduksi banyak antibakteri.

3. Umur bakteri

Bakteri Asam Laktat hanya dapat bertahan selama 1 bulan karena tidak menghasilkan spora. Umur bakteri sangat mempengaruhi produksi antibakteri. Kemungkinan Bakteri Asam Laktat yang terlalu tua akan mendekati fase kematian. Kemampuan bakteri akan berkurang untuk menyerap nutrisi sehingga permeabilitas membran terganggu. Umur bakteri yang sesuai dapat memproduksi banyak antibakteri secara optimal.

#### 4. Suhu

Bakteri Asam Laktat mampu bertahan pada suhu 30°C (anaerob fakultatif).

Suhu yang sesuai akan mempengaruhi banyak produksi antibakteri. Suhu

bakteri yang sesuai dapat dilihat dengan besarnya zona hambat

#### D. Uji antibakteri

Metode untuk uji antibakteri yaitu sebagai berikut :

##### 1. Metode difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk uji antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

##### 2. Metode dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

###### a. Metode dilusi cair

Metode ini bertujuan mengukur minimum inhibitory concentration(MH). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan

dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar hambat minimum (KHM), selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai Kadar Bunuh Minimal (KBM) (Kusmayati dan Agustini, 2007).

b. Metode dilusi padat

Metode ini hampir sama dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid) (Kusmayati dan Agustini, 2007)