

Efek Antimikroba Kombinasi Nisin dengan Minyak Atsiri Curcuma pada Mikroorganisme Patogen dan Pembusuk Pangan

Antimicrobial Effect of the Combination Between Nisin and Curcuma Essential Oil on Food Pathogenic and Spoilage Microorganisms

Rohula Utami^{1*}, Ardhea Mustika Sari¹, Asri Nursiwi¹, Dyah Ayu Ashari¹

¹Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36 A, Kentingan, Surakarta 57126, Indonesia

*Email: rohulautami@staff.uns.ac.id

Tanggal submit: 30 Oktober 2017; Tanggal penerimaan: 18 Februari 2019

ABSTRAK

Minyak atsiri dan nisin merupakan senyawa alami yang memiliki aktivitas antimikroba. Kedua senyawa antimikroba tersebut dikategorikan aman/*generally recognized as safe* (GRAS) dalam bahan pangan. Jumlah penambahan minyak atsiri dan nisin untuk menghambat pertumbuhan sel mikroba target dapat diketahui dengan metode *broth microdilution*. Kombinasi minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih (v/v) (0,25%; 0,5%; 1%; 2%; dan 4%) dengan nisin (b/v) (62,5 IU; 125 IU; 250 IU; 500 IU; dan 1000 IU) dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Eschericia coli* FNCC 0091, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, dan *Aspergillus niger* FNCC 6080. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, beberapa kombinasi dapat memberikan efek bakterisidal pada *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Eschericia coli* FNCC 0091, dan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070. Kombinasi antara nisin dengan minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih juga menunjukkan aktivitas yang sinergis pada beberapa mikroorganisme target.

Kata kunci: Kombinasi; curcuma; minyak atsiri; nisin; patogen

ABSTRACT

Essential oil and nisin are natural compounds that have antimicrobial activity. Both compounds are generally recognized as safe (GRAS). The concentration of essential oil and nisin needed to inhibit the growth of microorganisms can be determined using the microdilution method. The combination of Curcuma xanthorrhiza, Curcuma longa, and Curcuma zedoaria (v/v) (0.25%; 0.5%; 1%; 2%; and 4%) with nisin (b/v) (62.5 IU; 125 IU; 250 IU; 500 IU; and 1000 IU) could inhibit the growth of *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Eschericia coli* FNCC 0091, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, and *Aspergillus niger* FNCC 6080. In higher concentration, several combinations gave bacteriocidal effect on *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Eschericia coli* FNCC 0091, and *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070. The combination of nisin with Curcuma xanthorrhiza, Curcuma longa, and Curcuma zedoaria showed synergistic activities in several target microorganisms.

Keywords: Combination; curcuma; essential oil; nisin; pathogenic

PENDAHULUAN

Bahan pangan merupakan bahan yang mudah mengalami kontaminasi mikrobiologis, dimana kontaminasi mikrobiologis ini dapat memicu terjadinya kerusakan serta memicu keracunan makanan. Pada tahun 2014 dan 2015 di Indonesia, kasus keracunan pangan yang diduga (*suspect*) diakibatkan oleh kontaminasi mikrobiologis adalah penyebab terbesar kasus keracunan 51,06% dan 42,62% secara berturut-turut, dengan penyebab terbesar adalah *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* (BPOM, 2014; BPOM, 2015). Sedangkan di Amerika, kontaminasi mikrobiologis khususnya bakteri juga merupakan penyebab terbesar terjadinya kasus keracunan pangan selama empat tahun berturut-turut yaitu pada tahun 2011 hingga 2014 dengan penyebab terbesar berasal dari kontaminasi *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* (CDC, 2011; CDC, 2012; CDC, 2013; CDC, 2014). Perlu upaya penanganan untuk mencegah kontaminasi mikrobiologis pada bahan pangan untuk menghindari kerusakan serta keracunan pangan.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri sebagai hasil sintesa ribosom telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan berbagai bakteri (Yusuf dan Hamid, 2013). Dari berbagai jenis bakteriosin, nisin merupakan bakteriosin yang paling potensial dikembangkan, karena dapat menghambat pertumbuhan *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (Mauriello dkk., 2005), *Listeria monocytogenes* (Solomakos, 2008), *Staphylococcus aureus* (Pinto dkk., 2011) serta *Bacillus cereus*, *Lactobacillus sakei*, dan *Listeria monocytogenes* HPB 2812 (Turgis dkk., 2012). Selain itu, nisin dinyatakan GRAS atau *Generally Recognizes as Safe* oleh FDA (Ghraiiri dkk., 2012) dimana hal ini menunjukkan bahwa nisin sudah aman digunakan sebagai bahan tambahan pada bahan pangan. WHO juga sudah menetapkan ADI (*Acceptable Daily Intake*) nisin hingga sebesar 33.000 IU. Nisin juga tidak mengakibatkan efek toksik pada tubuh manusia, serta penambahan nisin pada bahan pangan memiliki kemungkinan yang sangat kecil dalam mempengaruhi sifat sensoris bahan pangan (Jozala dkk., 2015). Hanya saja, kekurangan dari nisin adalah kurang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif dan fungi serta harga yang relatif mahal (Nattress dan Lynda, 2003; Delves dan Weber, 2011).

Minyak atsiri yang merupakan metabolit sekunder dari tanaman juga memberikan efek antimikroba pada beberapa bakteri (Lacroix, 2007). Berbagai jenis tanaman dapat dijadikan sumber minyak atsiri, termasuk beberapa spesies tanaman dari genus *Curcuma* dimana kebanyakan spesies dari genus ini sudah terkenal

sebagai obat tradisional karena sifat antiparasit yang dimilikinya (Haddad dkk., 2010). Dari berbagai spesies yang ada, pada penelitian ini dipilih temulawak, kunyit, dan temu putih. Minyak atsiri temulawak mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas campestris*, *Myobacterium sp.* *Proteus vulgaris*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, dan juga *Bacillus megaterium* (Helen dkk., 2012). Minyak atsiri kunyit dapat menghambat *Aspergillus flavus* (Ferreira dkk., 2013), *Colletotricum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Culcuria palliscens*, *Fusarium oxysporium*, serta pada *Aspergillus niger* (Singh dkk., 2002), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus* dan *S. epidermidis* (Singh dkk., 2002). Sedangkan minyak atsiri temu putih juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Mawarni dkk., 2014), *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli* (Lai dkk., 2004). Selain memiliki aktivitas antimikroba, temulawak dan kunyit juga mudah didapatkan di Indonesia (Promosiana dan Atmojo, 2015). Minyak atsiri juga efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif dan kapang, namun penggunaan minyak atsiri pada produk pangan dalam kadar yang tinggi dapat berpengaruh terhadap nilai sensoris bahan pangan (Negi, 2012; Dwijatmoko dkk., 2016).

Dengan adanya kelebihan dan kekurangan dari nisin dengan minyak atsiri temulawak, kunyit, serta temu putih maka perlu dilakukan perlakuan kombinasi yang diharapkan akan meningkatkan efektivitas antimikroba keduanya, baik pada bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif, dan kapang. Selain itu, dengan kombinasi diharapkan konsentrasi penggunaan kedua bahan tersebut dapat diturunkan pada jumlah yang lebih kecil namun menghasilkan tingkat efektivitas yang sama saat penggunaan nisin dan minyak atsiri secara terpisah.

Beberapa kombinasi antara bakteriosin dengan minyak atsiri terbukti mampu menghasilkan aktivitas antimikroba yang lebih baik. Kombinasi minyak atsiri thyme 0,6% dengan nisin 1000 IU/g terbukti sinergis dalam menurunkan jumlah *Listeria monocytogenes* pada suhu 4 °C (Solomakos dkk., 2008). Kombinasi minyak atsiri *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* dengan nisin serta *Satureja montagna* dengan pediosin secara berturut-turut menunjukkan efek sinergis dalam menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes*,

Salmonella typhimurium, dan *Eschericia coli* O157:H7 (Turgis dkk., 2012).

Kombinasi antara nisin dengan minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih belum pernah dilakukan, padahal minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih memiliki potensi yang besar, baik dari aktivitas antimikrobanya, maupun ketersediaannya. Kombinasi ini diharapkan dapat digunakan untuk mencegah kontaminasi mikrobiologis pada bahan pangan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek kombinasi antimikroba pada beberapa mikroorganisme pembusuk dan patogen pada makanan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan berupa temulawak, kunyit, dan temu putih yang didapatkan dari pasar lokal di Surakarta dan nisin (Sigma Aldrich, 2,5%). Media yang digunakan berupa Mueller Hinton Broth diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany), Mueller Hinton Agar diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany), RPMI 1640 tanpa bikarbonat diperoleh dari Thermo Fisher Scientific (USA), dan Saboraud Dextrose Agar diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). Isolat murni *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Eschericia coli* FNCC 0091, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, dan *Aspergillus niger* FNCC 6080 diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta.

Destilasi Minyak Atsiri

Temulawak, kunyit, dan temu putih dicuci hingga bersih dan disortir. Setelah itu bahan dirajang dengan ketebalan 2–3 mm dan dikeringanginkan (Setiawan dkk., 2013). Bahan yang sudah kering ditimbang sebanyak 800 g dan didestilasi menggunakan destilator Stahl untuk mendapatkan minyak atsiri. Minyak atsiri yang didapat kemudian disimpan pada suhu ± 4 °C di dalam botol kaca hingga digunakan. Untuk mengetahui kandungan senyawa aktif didalam masing-masing minyak atsiri dilakukan pengujian menggunakan GCMS (Shimadzu QP 2010, Tokyo, Japan).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Uji MIC dilakukan menggunakan metode mikrodilusi yang sudah distandarisasi oleh *Clinical Laboratory Standard Institute/CLSI* (2012). Suspensi nisin disiapkan dengan melarutkan nisin ke dalam MHB atau RPMI 1640 tanpa bikarbonat yang disuplementasi 2% glukosa dan dimasukkan ke dalam tiap sumuran (*microplate*

96 well) hingga didapat konsentrasi akhir 1000 IU, 500 IU, 250 IU, 125 IU, dan 62,5 IU. Suspensi minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih dibuat dengan metode yang sama dengan nisin hingga konsentrasi akhir yang dicapai yaitu 4%, 2%, 1%, 0,5%, dan 0,25% (v/v). Volume total suspensi nisin dan minyak atsiri pada tiap sumuran adalah 100 μ l pada pengujian bakteri dan 200 μ l pada pengujian kapang. Pada pembuatan suspensi minyak atsiri dilakukan penambahan Tween 20 dengan konsentrasi penambahan sebesar 0,5% (v/v).

Inokulum bakteri dan kapang merupakan isolat dari FNCC. Kultur segar kemudian dilarutkan dalam garam fisiologis steril 0,85% dan dibandingkan secara visual dengan larutan standar McFarland 0,5. Inokulum standar kemudian diinokulasikan ke dalam tiap sumuran (*microplate* 96 well) kecuali pada sumuran kontrol negatif dan dilakukan inkubasi selama 20 jam pada pengujian MIC bakteri dan 48 jam pada pengujian MIC kapang pada suhu 35 ± 2 °C. Pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan (*triplicate*). Pengamatan pertumbuhan dilakukan pada tiap sumuran secara visual. Sumuran dengan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan pertumbuhan (suspensi di dalam sumuran tetap jernih) merupakan nilai MIC (CLSI, 2012; EUCAST, 2015).

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) dan Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Konsentrasi yang menunjukkan penghambatan/tidak menunjukkan pertumbuhan, kemudian diinokulasikan ke dalam media agar MHA atau SDA untuk mengetahui adanya efek bakterisidal maupun fungisidal. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada uji MBC bakteri dan 48 jam pada uji MFC kapang pada suhu 35 ± 2 °C. Media agar yang mengandung suspensi mikroba dan antimikroba dengan konsentrasi terkecil yang menunjukkan efek bakterisidal atau fungisidal (dapat membunuh mikroba di dalam suspensi/efek antimikroba bersifat permanen) merupakan nilai MBC dan MFC yang ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni mikroba pada media (Yu dkk., 2004).

Indeks FIC

Indeks FIC dihitung guna mengetahui efek perlakuan kombinasi terhadap aktivitas kedua antimikroba yang digunakan. Perhitungan indeks FIC sesuai dengan metode Sashidaran dkk. (2014) menggunakan nilai MIC dari masing-masing antimikroba dan juga kombinasi keduanya (Persamaan 1).

$$\text{Indeks FIC} = \text{FICA} + \text{FICB} = \frac{|\text{A}|}{\text{MICA}} + \frac{|\text{B}|}{\text{MICB}} \quad (1)$$

[A] merupakan konsentrasi dari senyawa antimikroba A, MICA dan FICA merupakan nilai MIC dan FIC dari senyawa antimikroba A begitu juga dengan [B], MICB, dan FICB. Indeks FIC dengan nilai $<0,5$ menunjukkan sinergisme pada kombinasi antimikroba dimana kedua antimikroba yang dikombinasikan mengalami peningkatan aktivitas, $0,5-0,75$ menunjukkan sinergisme parsial yang berarti kedua antimikroba yang dikombinasikan mengalami peningkatan aktivitas, hanya saja peningkatan tersebut tidak sebesar pada efek sinergis, $0,76-1$ menunjukkan adanya efek penambahan (*additive*) dimana kedua senyawa antimikroba mengalami peningkatan aktivitas, namun peningkatan tersebut lebih kecil dibanding efek sinergis parsial, $1-4$ menunjukkan tidak adanya efek sinergisme, dan >4 menunjukkan adanya efek antagonisme.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Senyawa dalam Minyak Atsiri

Minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih memiliki komponen penyusun yang berbeda-beda

Tabel 1. Senyawa kimia penyusun minyak atsiri (%)

| Senyawa kimia | <i>Curcuma xanthorrhiza</i> | <i>Curcuma longa</i> | <i>Curcuma zedoaria</i> |
|--|-----------------------------|----------------------|-------------------------|
| Ar-turmerone | - | 23,55 | - |
| Beta turmerone | - | 20,57 | - |
| Alpha turmerone | - | 16,83 | - |
| Delta elemene | 23,49 | - | - |
| Alpha longipinene | 8,65 | - | - |
| Calarene | 1,54 | - | 12,69 |
| 3-Methylene-2-norbonanone | - | - | 7,83 |
| bicyclo 2.2.1 heptan-2-one 1.7.7-trimethyl-, (1S) | - | - | 7,52 |
| Beta pinene | - | - | 2,87 |
| Apha phellandrene | - | 6,1 | - |
| Paracymene | - | 1,33 | - |
| Eucalyptol | 0,46 | 3,92 | 4,92 |
| Terpinolene | - | 2,29 | - |
| Ar curcumene | 8,51 | - | - |
| Beta sesquiphellandrene | - | 2,08 | - |
| Camphor | 8,67 | - | - |
| Germacrone | - | - | 6,84 |
| Beta eudesmol | 2,08 | - | 4,80 |
| Alpha bisabolol | 2,49 | - | - |
| Beta bisabolol | 3,18 | - | - |

(Tabel 1). Minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih banyak tersusun dari senyawa terpen, berupa monoterpen dan sesquiterpen. Aktivitas antimikroba dari minyak atsiri dipengaruhi oleh senyawa-senyawa penyusun tersebut. Komponen penyusun yang memiliki ion hidroksil memiliki aktivitas antimikroba yang cenderung lebih tinggi dari komponen penyusun yang lain (Saad dkk., 2013). Ketiga minyak atsiri memiliki komponen aktif penyusun yang sama sekali tidak memiliki ion hidroksil sehingga aktivitasnya tidak setinggi minyak atsiri dengan komponen penyusun yang memiliki ion hidroksil (carvacrol dan thymol). Aktivitas antimikroba tetap dimiliki ketiga oleh ketiga minyak atsiri karena ion hidroksil tidak menjadi syarat mutlak dalam menentukan aktivitas antimikroba dari minyak atsiri (O'bryan dkk., 2015). Selain itu, komponen-komponen yang ada dalam jumlah kecil (*trace*) juga mungkin berpengaruh terhadap aktivitas bakteristatis, bakterisidal, fungistatis, dan fungisidal dari minyak atsiri yang digunakan.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Penggunaan minyak atsiri temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), kunyit (*Curcuma longa*), temu putih

(*Curcuma zedoaria*), serta nisin terbukti dapat menghambat pertumbuhan mikrobia patogen dan mikrobia pembusuk pada pengujian dengan tiga kali ulangan (*triplicate*) (Tabel 2). Efektivitas minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih dalam menghambat beberapa mikroorganisme secara keseluruhan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Namun, pada beberapa mikroorganisme, seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*, minyak atsiri *Curcuma longa* dan *Curcuma zedoaria* bekerja dengan lebih efektif dibanding minyak atsiri *Curcuma xanthorrhiza*.

Kombinasi masing-masing dari ketiga minyak atsiri dengan nisin dilakukan untuk menurunkan konsentrasi kombinasi kedua senyawa antimikroba namun untuk mendapatkan aktivitas penghambatan dalam tingkat yang sama. Kombinasi tersebut terbukti dapat menurunkan konsentrasi penggunaan senyawa antimikroba dibandingkan penggunaan masing-masing antimikroba secara terpisah (Tabel 2).

Kombinasi minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih dengan nisin mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* FNCC 0057 pada konsentrasi terkecil dibanding dengan bakteri yang lain. Perusakan sel bakteri terjadi dikarenakan kation hidrofobik yang terdapat pada nisin akan mengikat fosfat yang bermuatan negatif. Hal ini mengakibatkan terganggunya transglukosilasi pada biogenesis dinding sel, selain itu nisin membentuk pori berukuran 2–2,5 nm yang mengakibatkan meningkatnya permeabilitas sel sehingga sel rusak. Peningkatan permeabilitas pada sel mengakibatkan komponen dan ion penting keluar dari sel yang mengakibatkan kematian pada sel bakteri target (Gulluce dkk., 2013; Yusuf dan Hamid, 2013; Jozala dkk., 2015; Garg dkk., 2014). Minyak atsiri yang juga bersifat hidrofobik meningkatkan aktivitas

pembentukan pori pada sel, sehingga perusakan sel lebih efektif (Burt, 2004; Bouayed, 2012).

Sedangkan pada bakteri Gram positif lainnya, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, diketahui bahwa dibutuhkan konsentrasi nisin dan minyak atsiri yang jauh lebih besar dibanding pada *Bacillus cereus* FNCC 0057. Kemampuan adaptasi yang sangat cepat oleh *Staphylococcus aureus* (Afifurahman dkk., 2014) memungkinkan mengakibatkan turunnya sensitivitas terhadap senyawa antimikroba yang dipakai. Hasil tersebut sama dengan penelitian sebelumnya dimana *Staphylococcus aureus* ATCC 2913 tidak dapat dihambat pertumbuhannya oleh nisin dan minyak atsiri *Cinnamomum cassia*, *Cymbopogon nardus*, dan *Origanum vulgare* (Turgis dkk., 2012). Meskipun begitu, kombinasi antara minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih dengan nisin tetap dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 0057, dengan kata lain, kombinasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas kedua senyawa antimikroba yang dikombinasikan meskipun tidak seefektif penghambatan pada *Bacillus cereus* FNCC 0057.

Sedangkan pada bakteri Gram negatif *Escherichia coli* FNCC 0091, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, dan *Salmonella typhimurium* FNCC 0050 (Tabel 2), MIC kombinasi lebih tinggi dibanding pada *Bacillus cereus* FNCC 0057. Hal ini dikarenakan, pada bakteri Gram negatif, mekanisme penghambatan lebih sulit terjadi, karena memiliki struktur sel yang lebih kompleks yang mengakibatkan penetrasi ke dalam sel lebih sulit terjadi (Zhou dkk., 2016). Aktivitas antimikroba terjadi jika senyawa antimikroba mencapai bagian periplasma dari bakteri Gram negatif. Minyak atsiri dapat melakukan perusakan pada bakteri gram negatif setelah mencapai periplasma melalui porin protein. Minyak atsiri masuk

Tabel 2. MIC nisin dan minyak atsiri pada mikroorganisme patogen dan pembusuk

| Mikroorganisme | MIC | | | | | | |
|---|------------|--------|--------|--------|-------------|---------------|---------------|
| | Nisin (IU) | CX (%) | CL (%) | CZ (%) | CX + Nisin | CL + Nisin | CZ + Nisin |
| <i>Bacillus cereus</i> FNCC 0057 | 500 | 1 | 1 | 1 | 0,5%+500 IU | 0,5%+62,5 IU | 0,25%+62,5 IU |
| <i>Salmonella typhimurium</i> FNCC 0050 | 2000 | >8 | 8 | 8 | 4%+1000 IU | 4%+500 IU | 4%+62,5 IU |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 0047 | >2000 | 4 | 4 | 2 | 2%+1000 IU | 2%+1000 IU | 1%+62,5 IU |
| <i>Escherichia coli</i> FNCC 0091 | 500 | 4 | 2 | 0,5 | 1%+250 IU | 0,5%+250 IU | 0,25%+250 IU |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> FNCC 0070 | 2000 | 2 | 4 | 2 | 1%+250 IU | 0,5%+250 IU | 0,25%+250 IU |
| <i>Aspergillus niger</i> FNCC 6080 | 1000 | 4 | 1 | 1 | 4%+62,5 IU | 0,25%+62,5 IU | 0,25%+500 IU |

Keterangan: CX : *Curcuma xanthorrhiza*, CL : *Curcuma longa*, CZ : *Curcuma zedoaria*

secara perlahan sebelum merusak membran dan dinding sel Gram negatif (O'bryan dkk., 2015).

Penggabungan kedua senyawa antimikroba pada *Aspergillus niger* FNCC 6080 mengakibatkan penghambatan yang efektif dan dapat menurunkan konsentrasi salah satu maupun kedua senyawa antimikroba (Tabel 2). Minyak atsiri kunyit dan temu putih yang lebih aktif dalam menghambat pertumbuhan kapang bekerja secara sinergis sehingga terjadi penurunan konsentrasi. Pada penelitian Hu dkk. (2017) minyak atsiri kunyit dapat menghambat germinasi spora *Aspergillus flavus* selain itu juga dapat menghambat metabolisme ergosterol. Ergosterol merupakan sterol yang menjaga fungsi dan kekokohan dari sel. Minyak atsiri temulawak dan temu putih dimungkinkan melakukan penghambatan dengan mekanisme yang sama melalui penghambatan germinasi spora dan penghambatan terhadap metabolisme ergosterol dari *Aspergillus niger*.

Penggunaan minyak atsiri temu putih yang dikombinasikan dengan nisin, lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk pada pangan. Sedangkan pada kapang, kombinasi nisin dengan minyak atsiri kunyit menunjukkan hasil yang lebih baik.

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) dan Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Kombinasi nisin dengan minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih selain memberikan efek bakteriostatis, juga memberikan efek bakterisidal (Tabel 3). Kombinasi yang mulai menunjukkan efek bakterisidal adalah kombinasi antara minyak atsiri temu putih dengan nisin pada bakteri *Salmonella typhimurium* FNCC 0050 dan *Escherichia coli* FNCC 0091 pada konsentrasi 4% minyak atsiri 1000 IU nisin dan 4% minyak atsiri dengan nisin 62,5 IU secara berturut-turut. Sedangkan kombinasi antara minyak atsiri temulawak dengan nisin

mulai menunjukkan efek bakterisidal pada *Escherichia coli* FNCC 0091 pada konsentrasi 4% tanpa penambahan nisin dan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 pada konsentrasi 2% dan nisin 500 IU. Sedangkan kombinasi ketiga minyak atsiri dengan nisin tidak menunjukkan efek fungisidal pada *Aspergillus niger* FNCC 6080.

Bacillus cereus FNCC 0057 memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap ketiga kombinasi nisin dengan minyak atsiri yang digunakan. Hal tersebut membuktikan bahwa ketiga kombinasi minyak atsiri dengan nisin menghasilkan efek bakterisidal pada bakteri *Bacillus cereus* FNCC 0057, dimana pengaruh dari senyawa antimikroba yang ditambahkan bersifat permanen (Faleiro, 2011). *Bacillus cereus* FNCC 0057 tidak mampu untuk tumbuh kembali, meskipun sudah ditumbuhkan kembali pada media baru. Efek yang permanen ini diakibatkan oleh *Bacillus cereus* FNCC 0057, yang merupakan bakteri Gram positif, dipengaruhi oleh kedua senyawa antimikroba yang dikombinasikan. Proses yang terjadi ini sama dengan mekanisme penghambatan, hanya saja efek bakterisidal ini terjadi pada konsentrasi yang lebih besar, sehingga dapat membunuh seluruh mikroba (bakterisidal).

Hal yang sama terjadi pada *Salmonella typhimurium* FNCC 0057, *Escherichia coli* FNCC 0091, dan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 yang terkena kombinasi minyak atsiri temu putih 4% ditambah 1000 IU nisin, minyak atsiri temulawak 4% dan minyak atsiri temu putih 4% dengan nisin 62,5 IU, serta minyak atsiri temulawak 2% dengan nisin 500 IU secara berturut-turut. Mekanisme bakterisidal pada bakteri Gram negatif sama dengan mekanisme penghambatan hanya saja untuk memberikan efek bakterisidal dibutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi dibanding pada penghambatan.

Penambahan senyawa antimikroba yang dikombinasikan tidak memberikan efek bakterisidal pada bakteri *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dan tidak memberikan efek fungisidal pada kapang *Aspergillus*

Tabel 3. Minimum bactericidal dan minimum fungicidal concentration

| Mikroorganisme | MBC/MFC | | |
|---|-------------|-------------|--------------|
| | CX + nisin | CL + nisin | CZ + nisin |
| <i>Bacillus cereus</i> FNCC 0057 | 4% +125 IU | 4% + 125 IU | 4% + 62,5 IU |
| <i>Salmonella typhimurium</i> FNCC 0050 | BD | BD | 4% + 1000 IU |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 0047 | BD | BD | BD |
| <i>Escherichia coli</i> FNCC 0091 | 4% + 0 IU | BD | 4% + 62,5 IU |
| <i>Pseudomonas fluorescense</i> FNCC 0070 | 2% + 500 IU | BD | BD |
| <i>Aspergillus niger</i> FNCC 6080 | BD | BD | BD |

Keterangan: CX : Curcuma xanthorrhiza, CL : Curcuma longa, CZ : Curcuma zedoaria, BD : Belum diketahui, konsentrasi yang memberikan efek bakterisidal dan fungisidal >4% + 1000 IU

niger FNCC 6080. Penambahan senyawa antimikroba pada kedua mikroba tersebut hanya memberikan efek bakteriostatik dan fungistatik pada kedua antimikroba. Efek tersebut hanya mengakibatkan penghambatan dimana setelah senyawa antimikroba dinetralkan, sel mikroba dapat kembali aktif (Faleiro, 2011).

Indeks FIC

Indeks FIC menunjukkan aktivitas yang terjadi antara kedua senyawa antimikroba yang dikombinasikan (Tabel 4). Nisin bekerja secara sinergis parsial saat dikombinasikan dengan minyak atsiri temulawak dalam menghambat *Escherichia coli* FNCC 0091 dan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, sedangkan dalam menghambat *Salmonella typhimurium* FNCC 0050 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 menunjukkan aktivitas aditif. Sedangkan pada dua mikroorganisme lainnya yaitu *Bacillus cereus* FNCC 0057 dan *Aspergillus niger* FNCC 6080 kombinasi keduanya tidak menunjukkan efek satu dengan lainnya.

Kombinasi antara minyak atsiri kunyit dengan nisin menunjukkan aktivitas yang sinergis saat digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 dan *Aspergillus niger* FNCC 6080. Sedangkan saat digunakan untuk menghambat *Bacillus cereus* FNCC 0057, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, dan *Escherichia coli* FNCC 0091 menunjukkan aktivitas yang sinergis parsial. Pada saat digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 kombinasi antara minyak atsiri kunyit dan nisin bersifat aditif satu dengan lainnya.

Kombinasi minyak atsiri temu putih dengan nisin menunjukkan aktivitas yang sinergis saat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* FNCC 0057. Aktivitas keduanya sinergis parsial saat digunakan untuk menghambat *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070, dan *Aspergillus niger* FNCC 6080. Saat digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* FNCC 0091 kombinasi keduanya tidak menunjukkan aktivitas yang saling mempengaruhi.

Aktivitas kombinasi antar kedua antimikroba yang meningkat diakibatkan oleh mekanisme kerja keduanya yang hampir sama, sehingga saat keduanya digabungkan mengakibatkan peningkatan aktivitas dari kedua senyawa antimikroba. Nisin dan minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih memiliki sifat hidrofobik dimana keduanya dapat mengubah struktur sel target yang mengakibatkan kebocoran komponen dan ion penting dari dalam sel, sehingga komponen dan ion penting tersebut tidak dapat digunakan oleh sel untuk melakukan metabolisme sebagaimana mestinya (Garg dkk., 2014; Jozala dkk., 2015; Burt, 2004). Hal

tersebut pada akhirnya yang akan memicu kematian sel. Penurunan salah satu atau kedua konsentrasi antimikroba yang ditambahkan menunjukkan adanya pengaruh antar antimikroba yang ditambahkan, meskipun ada beberapa yang tidak memberikan dampak satu dengan yang lain.

Penggunaan minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih yang dikombinasikan dengan nisin menunjukkan efektivitas yang lebih baik dibanding penggunaan secara terpisah. Secara keseluruhan, penggunaan nisin yang dikombinasikan dengan minyak atsiri temu putih menunjukkan efektivitas yang lebih baik dibanding dua minyak atsiri yang lain (Tabel 2, Tabel 3, dan Tabel 4). Perbedaan efektivitas diakibatkan karena perbedaan komponen penyusun minyak atsiri dan besaran dari masing-masing komponen penyusun (Tabel 1). Aktivitas antimikroba dari minyak atsiri dihasilkan dari interaksi antar komponen penyusun sehingga aktivitas yang ditunjukkan juga berbeda (Cabarkapa dkk., 2016).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa, kombinasi antara nisin dengan minyak atsiri kunyit, temulawak, dan temu putih dapat meningkatkan sensitivitas antimikroba pada beberapa mikroorganisme perusak dan patogen pada bahan pangan. Aktivitas antimikroba yang dihasilkan hingga pada taraf

Tabel 4. Aktivitas dari kombinasi antimikroba

| Mikroorganisme | <i>Curcuma xanthorrhiza</i> + nisin | | <i>Curcuma longa</i> + nisin | | <i>Curcuma zedoaria</i> + nisin | |
|--|-------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|
| | Indeks FIC | Aktivitas | Indeks FIC | Aktivitas | Indeks FIC | Aktivitas |
| <i>Bacillus cereus</i> FNCC 0057 | 1,500 | Tidak sinergis | 0,625 | Sinergis parsial | 0,375 | Sinergis |
| <i>Salmonella typhimurium</i> FNCC 0050 | 0,994* | Aditif | 0,750 | Sinergis parsial | 0,531 | Sinergis parsial |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 0047 | 0,998* | Aditif | 0,998* | Aditif | 0,531* | Sinergis parsial |
| <i>Escherichia coli</i> FNCC 0091 | 0,750 | Sinergis parsial | 0,750 | Sinergis parsial | 1,500 | Tidak sinergis |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> FNCC 0070 | 0,500 | Sinergis parsial | 0,250 | Sinergis | 0,500 | Sinergis parsial |
| <i>Aspergillus niger</i> FNCC 6080 | 1,063 | Tidak sinergis | 0,313 | Sinergis | 0,750 | Sinergis parsial |

Keterangan: Indeks FIC <0,5 (sinergis); Indeks FIC 0,5-0,75 (sinergis parsial), Indeks FIC 0,76-1 (aditif), Indeks FIC 1-4 (tidak sinergis), Indeks FIC >4 (antagonis); *: MIC Nisin atau MIC minyak atsiri yang digunakan untuk menghitung indeks FIC melebihi konsentrasi yang ditentukan

penghambatan dan beberapa lainnya hingga memberikan efek bakterisidal. Kombinasi yang dilakukan menimbulkan efek sinergis, sinergis parsial, aditif, dan tidak sinergis pada kedua senyawa antimikroba, namun sebagian besar dari kombinasi tersebut memiliki efek aktivitas yang sinergis maupun sinergis parsial sehingga aktivitas kedua antimikroba yang dikombinasikan meningkat. Kombinasi antara minyak atsiri kunyit dengan nisin dapat memberikan efek sinergis pada *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0070 dan *Aspergillus niger* FNCC 6080. Kombinasi minyak atsiri temu putih dengan nisin menunjukkan aktivitas yang sinergis pada *Bacillus cereus* FNCC 0057. Kombinasi antara minyak atsiri temulawak, kunyit, dan temu putih dengan nisin dapat diaplikasikan pada bahan pangan untuk menurunkan tingkat kontaminasi mikrobiologis dan mencegah kerusakan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Universitas Sebelas Maret yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Unggulan Fakultas (UF-UNS) dana PNPB tahun 2017 melalui No. Kontrak 623/UN27.21/PP/2017.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak adanya *conflict of interest* pada tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Affurrahman, Samadin, K. H., & Aziz, S. (2014). Pola kepekaan bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik vancomycin di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. *MKS*, 46(4), 266-270.
- Bouayed, J. (2012). *Nutrition well being and health*. Croatia: InTech.
- BPOM. (2015). *Laporan Tahunan Tahun 2014 Badan Pengawas Obat dan Makanan*. Jakarta: BPOM.
- BPOM. (2016). *Laporan tahunan tahun 2015 Badan Pengawas Obat dan Makanan*. Jakarta: BPOM.
- Broughton, J. D., & Weber, G. (2011). *3 - Nisin, Natamycin and Other Commercial Fermentates Used in Food Biopreservation*. England: Woodhead Publishing Limited.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cabarkapa, I. S., Duragic, O. M., & Kostadinovic, L. M. (2016). Essential oils: mode of antimicrobial activity and potential application in food systems. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27(3), 61-64.
- CAC. (2015). *Provisions for Cyclotetraglucose (INS 1504(i)), Cyclotetraglucose Syrup (INS 1504(ii)) And Nisin (INS 234)*. Xian: Codex Alimentarius Commission.
- CDC. (2014). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2011: Annual Report*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC.
- CDC. (2014). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2012: Annual Report*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC.
- CDC. (2015). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC.
- CDC. (2016). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2014: Annual Report*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC.
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dwijatmoko, M. I., Praseptiangga, D., & Muhammad, D. R. (2016). Effect of cinnamon essential oils addition in the sensory attributes of dark chocolate. *Nusantara Bioscience*, 8(2), 301-305. [10.13057/nusbiosci/n080227](https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n080227)
- EUCAST. (2015). *Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents*. Copenhagen: EUCAST.
- Faleiro, M. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Formatex*, 1143-1156.
- Ferreira, F. D., Mossini, S. A., Ferreira, F. M., Arrotéia, C. C., Costa, C. L., Nakamura, C. V., et al. (2013). The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essential oil and curcumin on *Aspergillus flavus* link growth and morphology. *The Scientific World Journal*, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.003>
- Garg, N., Oman, T. J., Wang, T.-S. A., Gonzalo, C. V., Walker, S., & Donk, W. A. (2014). Mode of action and structure–activity relationship studies of geobacillin I. *The Journal of Antibiotics*, 2014(67), 133-136.
- Ghraiiri, T., Chaftar, N., & Hani, K. (2012). *Progress in Food Preservation*. United Kingdom: Willey Blackwell.
- Güllüce, M., Karadayı, M., & Barış, Ö. (2013). Bacteriocins: promising natural antimicrobials. *Formatex*, 1016-1027.
- Haddad, M., Sauvain, M., & Deharo, E. (2010). Curcuma as a parasiticidal agent: a review. *Planta Medica* 2011, 672-678. [10.1055/s-0030-1250549](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250549)

- Helen, P. A. M., Susheela G. K., Jayasree S., Nizy A. M., Rajagopal B., & Jeeva S. (2012). Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2. 10.1016/S2221-1691(12)60288-3
- Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., & Yang, M. (2017). Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry* 220, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179>
- Jozala, A. F., Novaes, L. C., & Junior, A. P. (2015). *Nisin*. Croatia: InTech.
- Kementan. (2015). *Statistik Produksi Hortikultura Tahun 2014*. (A. Promosiana, & H. D. Atmojo, Penyunt.) Jakarta: Direktorat Jenderal Hortikultura Kementerian Pertanian.
- Lacroix, M. (2007). The use of essential oils and bacteriocins as natural antimicrobial and antioxidant compounds. *Food*, 1(2), 181-192.
- Lai, E. Y., Chyau, C.-C., Mau, J.-L., Chen, C.-C., Lai, Y.-J., Shih, C.-F., et al. (2004). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 32(2), 281-290. 10.1142/S0192415X0400193X
- Mauriello, G., Luca, E. D., Storia, A. L., Villani, F., & Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 464-469. 10.1111/j.1472-765X.2005.01796.x
- Nattress, F. M., & Baker, L. P. (2003). Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 259-267. 10.1016/S0168-1605(02)00545-7
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 7-17. 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- O'Bryan, C. A., Pendleton, S. J., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture – in vitro studies on antibacterial mode of action. *Frontier in Veterinary Science*, 2, 1-8. 10.3389/fvets.2015.00035
- Pinto, M. S., Carvalho, A. F., Pires, A. C., Souza, A. A., Silva, P. H., Sobral, D., et al. (2011). The effect of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of traditional minas serro cheese. *International Dairy Journal*, 21, 90-96. 10.1016/j.idairyj.2010.08.001
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 2013(28), 269-279.
- Setiawan, A., Utami, R., & Kawiji. (2013). Pengaruh penambahan minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) pada edible film terhadap karakteristik organoleptik dan antimikrobia. *Jurnal Teknosains Pangan*, 2(3), 9-14.
- Singh, G., Singh, O. P., & Maurya, S. (2002). Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2002, 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0960-8974\(02\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8974(02)00030-X)
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80(2008), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.002>
- Turgis, M., Vu, K. D., Dupont, C., & Lacroix, M. (2012). Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*, 48(2012), 696-702. 10.1016/j.foodres.2012.06.016
- Yusuf, M. A., & Hamid, T. H. (2013). Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: a mini review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 3(4), 44-50.
- Zhou, L., Heel, A. J., Montalban-Lopez, M., & Kulpers, O. P. (2016). Potentiating the activity of nisin against *Escherichia coli*. *Frontiers in Cell and Development Biology*, 4, 1-9. 10.3389/fcell.2016.00007