

KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT *Lactobacillus* sp. RED₁ DARI CINCALOK FORMULASI

Dwi Isyana Achmad^{1*}, Risa Nofiani¹, Puji Ardiningsih¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi,

*email: isyanaadwi@gmail.com

ABSTRAK

Cincalok merupakan makanan khas Kalimantan Barat yang proses fermentasinya terjadi secara alami dengan bantuan mikroba. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu mikroba yang berperan dalam proses fermentasi tersebut. Salah satu isolat BAL dari cincalok formulasi yaitu *Lactobacillus* sp. RED₁. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ yang meliputi: toleransi asam, aktivitas enzim (amilase, protease dan lipase), kemampuan produksi asam dan aktivitas antimikroba. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ tidak mampu bertahan hidup pada pH 1 dan 2 yang merupakan pH saluran pencernaan sehingga tidak dapat dijadikan sebagai bakteri probiotik. Isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ tidak memiliki aktivitas enzim amilase, protease dan lipase sehingga keberadaannya tidak menyebabkan pembusukan dan bau tengik pada bahan makanan. Isolat ini juga mampu menurunkan pH media dari 5,8 menjadi 3,79 selama waktu inkubasi 48 jam dan memiliki aktivitas antimikroba yang ditunjukkan dengan kemampuannya menghambat pertumbuhan 8 mikroba uji sehingga dapat diaplikasikan sebagai kultur starter dan pengawet makanan.

Kata Kunci : BAL, cincalok formulasi, *Lactobacillus* sp. RED₁, karakterisasi.

PENDAHULUAN

Cincalok merupakan makanan fermentasi tradisional khas Kalimantan Barat. Proses fermentasinya terjadi secara alami dengan bantuan mikroba dari lingkungan. Salah satu mikroba yang berperan penting dalam proses fermentasi adalah bakteri asam laktat (BAL). *Lactobacillus* sp. dan *Streptococcus* sp. merupakan isolat BAL yang berhasil diisolasi dari cincalok alamiah (Widhyastuti, 2011). Selain BAL, juga terdapat mikroba lain seperti jamur, bakteri pembusuk dan patogen, sehingga kualitas cincalok alamiah dapat berubah dan keamanannya kurang terjamin untuk setiap produksi.

Beberapa keunggulan yang dimiliki BAL yaitu: 1) BAL mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang dapat memberikan rasa dan aroma spesifik pada makanan fermentasi (Rahayu, 2001), 2) BAL mampu meningkatkan nilai cerna pada makanan fermentasi karena dapat melakukan pematangan pada bahan makanan yang sulit dicerna sehingga dapat langsung diserap oleh tubuh, misalnya protein diubah menjadi asam-asam amino (Guerra et al., 2006), 3) BAL menghasilkan senyawa antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk pada bahan makanan sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk tersebut. Senyawa-senyawa antimikroba yang dihasilkan BAL antara lain: asam laktat, hidrogen peroksida, CO₂, dan bakteriosin (Holzapfel et

al., 1995). Produk utamanya yaitu asam laktat yang dapat terakumulasi pada lingkungan di sekitarnya sehingga pH dapat menurun hingga pH 4,0-4,8. Hal ini menyebabkan mikroba patogen dan pembusuk yang umumnya hidup pada pH 6,0-8,0 tidak dapat tumbuh.

Isolat BAL dari genus *Lactobacillus* dan *Streptococcus* juga telah diisolasi dari berbagai produk fermentasi seperti susu kerbau fermentasi asal Minangkabau (Surono dan Nurani, 2001). Isolat BAL dari Boza (makanan fermentasi tradisional dari Turki) merupakan genus *Lactobacillus*, *Lactococcus* dan *Leuconoctoc* (Sahingil et al., 2009). Selain itu, isolat BAL *Lactobacillus sakei* juga berhasil diisolasi dari Filzetta (makanan fermentasi tradisional dari Itali) (Conter et al., 2005). Setiap isolat BAL tersebut memiliki karakter yang berbeda-beda. Isolat BAL dari genus *Lactobacillus* umumnya berpotensi sebagai agen probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan manusia dan hewan (Rahayu, 2007).

Studi formulasi cincalok skala laboratorium telah dilakukan oleh Dyastuti (2012). Salah satu profil mikroba yang telah dihitung jumlahnya dalam penelitian tersebut adalah BAL. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat BAL dari cincalok formulasi merupakan genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* dan *Enterococcus*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik salah satu isolat BAL genus *Lactobacillus* yaitu *Lactobacillus* sp.

RED₁. Isolat ini merupakan isolat BAL dari salah satu formula cincalok dengan perbandingan komposisi udang, gula, garam, dan serbuk bawang putih sebesar 20:4:1:1. Karakteristik BAL yang akan diuji meliputi: toleransi asam, aktivitas enzim (amilase, protease dan lipase), kemampuan produksi asam dan aktivitas antimikroba. Hasil karakterisasi dapat digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ sebagai bakteri probiotik, kultur *starter* dan pengawet makanan.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoclave*, cawan petri, *centrifuge*, filter 0,22µm, *hot plate*, jangka sorong, kawat ose, laminar, mikropipet, mikroskop, neraca analitik, pembakar bunsen, pH meter, dan seperangkat alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Bahan-bahan yang digunakan adalah agar, akuades, alkohol, asam klorida, *buffer* pH 4 dan 7, *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS), ekstrak ragi, kalsium karbonat, larutan Gram, margarin, natrium hidroksida, natrium klorida, *nutrient agar* (NA), pepton, *phosphat buffer saline* (PBS), dan susu skim. Mikroba uji yang digunakan yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* dan *Candida albicans*.

Isolat yang digunakan pada penelitian ini merupakan salah satu isolat BAL genus *Lactobacillus* yaitu *Lactobacillus* sp. RED₁ dari cincalok formulasi.

Karakterisasi BAL

Uji toleransi asam dilakukan dengan menggunakan beberapa variasi pH larutan *phosphat buffer saline* (PBS) (Guerra *et al.*, 2006). Isolat BAL diinokulasikan pada media MRS cair dan diinkubasi selama 14-16 jam. Sebanyak 1% subkultur BAL (OD₆₅₀) diinokulasikan pada media MRS cair dan diinkubasi selama 18 jam. Kultur BAL diendapkan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 3.000 x g selama 15 menit. Pelet yang diperoleh dicuci menggunakan PBS steril (pH 7,2). Setelah itu pelet dilarutkan dengan PBS steril 1:100 dengan variasi pH 1, 2 dan 3 dan waktu inkubasi selama 2 dan 4 jam. Sebanyak 50µL aliquot disebarkan pada cawan petri, kemudian dituangkan media MRS agar

dan diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji aktivitas enzim meliputi tiga jenis enzim, yaitu enzim amilase, protease dan lipase (Widhyastuti, 2011). Uji aktivitas enzim amilase dilakukan dengan menggoreskan satu ose BAL pada cawan petri, kemudian dituangkan media MRS agar yang diperkaya pati sebanyak 1%. Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggoreskan satu ose BAL pada cawan petri, kemudian dituangkan media MRS agar yang diperkaya susu skim 1%. Uji aktivitas enzim lipase dilakukan dengan menggoreskan satu ose BAL pada cawan petri, kemudian dituangkan media MRS agar yang diperkaya margarin 2%. Diinkubasi secara anaerob selama 2-4 hari. Selanjutnya diamati zona bening yang terbentuk.

Uji kemampuan produksi asam dilakukan dengan cara mengukur perubahan pH media (Piraino *et al.*, 2007). Isolat BAL diinokulasikan pada media MRS cair dan diinkubasi selama 14-16 jam. Sebanyak 5% v/v subkultur BAL (OD₆₅₀) diinokulasikan pada media MRS cair. Setelah itu dilakukan pengukuran pH pada setiap variasi waktu yaitu 4, 8, 12, 24 dan 48 jam.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan sumur (*well*) (Papamanoli *et al.*, 2003). Isolat BAL yang akan diuji diinokulasikan pada media MRS cair dan diinkubasi selama 14-16 jam. Sebanyak 1% v/v subkultur BAL (OD₆₅₀) diinokulasikan pada media MRS cair dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah itu kultur BAL diendapkan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 3.000 x g selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian disaring menggunakan filter 0,22µm sehingga diperoleh supernatan steril. Supernatan steril tersebut dipipet sebanyak 20µL dan dimasukkan ke dalam sumur pada media NA yang telah diinokulasikan mikroba uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar sumur diukur diameternya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat BAL yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat *Lactobacillus* sp. RED₁. Isolat tersebut merupakan bakteri Gram positif dengan sel berbentuk batang.

Salah satu kriteria penting yang dapat dijadikan indikator suatu isolat BAL sebagai bakteri probiotik yaitu ketahanannya pada kondisi asam atau pH rendah yang menggambarkan kondisi saluran pencernaan manusia. Uji toleransi asam dilakukan dengan menggunakan variasi pH 1, 2 dan 3, selanjutnya diamati koloni BAL yang mampu bertahan hidup

pada pH tersebut selama 2 dan 4 jam. Proses pencernaan manusia umumnya terjadi selama 2 hingga 4 jam. Oleh karena itu, diharapkan BAL mampu bertahan pada kondisi asam selama proses pencernaan bahan makanan yang berlangsung di saluran pencernaan.

Hasil uji toleransi asam dari isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ menunjukkan bahwa isolat tersebut hanya mampu bertahan hidup pada pH 3 selama waktu inkubasi 4 jam. Tidak ada koloni BAL yang tumbuh pada pH 1 dan 2. Hal ini diduga karena dinding sel bakteri terganggu dan mengalami lisis ketika kondisi lingkungan sangat asam, sehingga pertumbuhannya terhambat bahkan tidak dapat tumbuh pada kondisi tersebut (Guerra *et al.*, 2006). BAL yang dapat bertahan pada pH rendah (pH 1 dan 2) berpotensi sebagai bakteri probiotik karena diharapkan dapat bertahan hidup pada saluran pencernaan yang kondisinya asam (pH 2).

Uji aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ dalam menghasilkan enzim amilase, protease dan lipase. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak menunjukkan aktivitas enzim amilase yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni BAL. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan media MRS agar yang diperkaya pati sebagai sumber karbohidrat. Pati merupakan polisakarida yang dapat terhidrolisis menjadi karbohidrat yang lebih sederhana dengan adanya enzim amilase. Isolat BAL yang diuji merupakan isolat yang habitat hidupnya tidak kaya karbohidrat. Hal ini diduga menyebabkan isolat BAL dari cinalok formulasi ini tidak memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase.

Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan media MRS agar yang diperkaya susu skim sebagai sumber protein. Protein merupakan substrat bagi enzim protease dan dapat diubah menjadi asam-asam amino penyusunnya melalui proses hidrolisis. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ tidak memiliki aktivitas enzim protease yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Isolat BAL dari produk lain ada yang menunjukkan aktivitas enzim protease yaitu isolat dari pasta keju asal Itali dan beberapa jenis ikan laut di Algeria (Piraino *et al.*, 2007; Sahnouni *et al.*, 2012). Keberadaan enzim protease pada bahan makanan yang kaya protein dapat merugikan karena proses pembusukan akan lebih cepat terjadi.

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL dalam

menghasilkan enzim lipase. Enzim lipase merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis lemak menjadi asam lemak yang dapat menyebabkan bau tengik pada bahan makanan, sehingga keberadaan BAL yang dapat menghasilkan enzim ini dapat menurunkan kualitas produk makanan. Uji ini menggunakan media MRS agar yang diperkaya margarin sebagai sumber lemak. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ tidak memiliki aktivitas enzim lipase yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

Tidak terlihatnya aktivitas enzim amilase, protease dan lipase dari isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ menunjukkan bahwa keberadaan bakteri ini pada bahan makanan tidak menyebabkan pembusukan dan bau tengik, sehingga tidak menurunkan kualitas bahan makanan.

Hasil uji kemampuan produksi asam yang dilakukan pada isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menurunkan pH media dari 5,8 menjadi 3,79 dalam waktu 48 jam (Tabel 1). Terjadi penurunan pH secara drastis dalam waktu 24 jam pertama, namun setelah 48 jam penurunan pH tidak drastis. Hal ini diduga karena pada waktu inkubasi 48 jam telah mencapai fase stasioner sehingga kemampuan BAL untuk menghasilkan asam laktat menurun. Selain itu, diduga dapat juga disebabkan karena substrat pada media yang dapat diubah menjadi asam laktat telah habis.

Tabel 1. Nilai pH Media pada Variasi Waktu Inkubasi

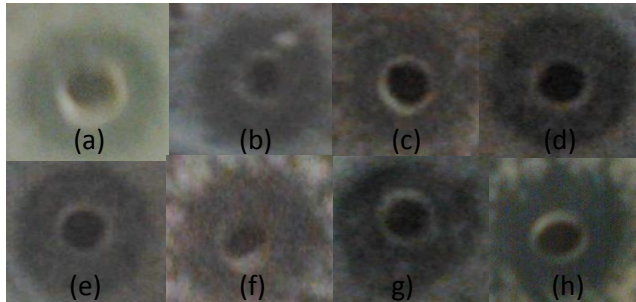
Waktu inkubasi	pH media
4 jam	5,19 ± 0,01
8 jam	4,30 ± 0,01
12 jam	4,12 ± 0,08
24 jam	3,91 ± 0,02
48 jam	3,79 ± 0,01

Keterangan : pH media 5,8. Nilai pH merupakan rata-rata ± standar deviasi.

Kemampuan produksi asam dari BAL berperan penting dalam aktivitas antimikroba. Produksi asam laktat oleh BAL menyebabkan pH pada makanan hasil fermentasi rendah. Hal ini dapat menghambat mikroba patogen dan pembusuk untuk tumbuh sehingga memperpanjang umur simpan produk makanan tersebut. Umumnya mikroba patogen dan pembusuk dapat tumbuh antara pH 6,0–8,0 (Fardiaz, 1992; Buckle *et al.*, 2007). Semakin cepat BAL mampu menurunkan pH pada makanan fermentasi, maka semakin cepat pula penghambatan terhadap kebusukan bahan makanan tersebut. Selain itu, BAL yang mampu menghasilkan asam dalam jumlah yang banyak

dapat dimanfaatkan sebagai kultur *starter* pada produksi yogurt dan beberapa makanan fermentasi.

Uji aktivitas antimikroba isolat BAL dilakukan untuk mengetahui sensitivitas BAL terhadap mikroba uji yang dilihat dari diameter zona bening yang terbentuk (Gambar 1). Besarnya diameter zona bening yang terbentuk dari isolat BAL berbanding lurus dengan aktivitas antimikroba isolat tersebut dalam menghambat pertumbuhan mikroba uji (Sahnouni *et al.*, 2012).



Gambar 1. Zona bening yang terbentuk dari isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ terhadap mikroba uji (a). *A. hydrophila*, (b). *B. cereus*, (c). *B. Sp.*, (d). *B. subtilis*, (e). *C. freundii*, (f). *Enterobacter* sp., (g). *K. pneumoniae*, (h). *V. cholerae*.

Hasil uji aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus* sp. RED₁, memiliki kemampuan hambat terhadap 8 mikroba uji (Tabel 2). Hal ini dapat terlihat dari terbentuknya zona bening di sekitar sumur (*well*). Aktivitas antimikroba isolat BAL tersebut diduga karena BAL menghasilkan senyawa-senyawa antimikroba seperti asam laktat, H₂O₂ dan bakteriosin yang mampu merusak dinding sel bakteri patogen.

Tabel 2. Aktivitas Antimikroba Isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ terhadap Mikroba Uji

Mikroba	Diameter zona bening (cm)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,81
<i>Bacillus cereus</i>	1,09
<i>Bacillus</i> sp.	1,09
<i>Bacillus subtilis</i>	1,50
<i>Citrobacter freundii</i>	1,04
<i>Enterobacter</i> sp.	1,44
<i>Eschericia coli</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella</i> sp.	-
<i>Vibrio cholerae</i>	1,39
<i>Candida albicans</i>	-

Mikroba uji yang digunakan merupakan bakteri dan jamur penyebab penyakit yang banyak ditemukan di lingkungan sekitar manusia yang tergolong dalam bakteri Gram

positif dan negatif. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan hambat isolat-isolat BAL terhadap bakteri Gram positif dan negatif. Umumnya bakteri Gram negatif memiliki ketahanan yang lebih baik terhadap senyawa antimikroba dibanding bakteri Gram positif. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dari pada bakteri Gram positif, sehingga senyawa antimikroba akan lebih mudah masuk ke dalam sel bakteri Gram positif. Masuknya senyawa antimikroba mengakibatkan perubahan permeabilitas pada dinding sel bakteri. Hal ini menyebabkan kebocoran nutrisi dan terganggunya metabolisme sel yang berakibat pada kematian bakteri tersebut (Presscot *et al.*, 2003).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ dari cincalok formulasi tidak mampu bertahan hidup pada pH 1 dan 2 sehingga tidak dapat dijadikan sebagai bakteri probiotik. Isolat *Lactobacillus* sp. RED₁ tidak memiliki aktivitas enzim amilase, protease dan lipase sehingga keberadaannya tidak menyebabkan pembusukan dan bau tengik pada bahan makanan. Isolat ini juga mampu menurunkan pH media dari 5,8 menjadi 3,79 selama 48 jam dan menghambat pertumbuhan 8 mikroba uji yaitu: *A. hydrophila*, *B. cereus*, *B. sp.*, *B. subtilis*, *C. freundii*, *Enterobacter* sp., *K. pneumoniae*, dan *V. cholerae* sehingga dapat diaplikasikan sebagai kultur *starter* dan pengawet makanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet, G.H., and Wootton, M., 2007, Ilmu Pangan, Penerjemah: Hari Purnomo dan Adiono, Universitas Indonesia, Jakarta
- Conter M., Muscariello T., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Campanini G., Ianieri A., 2005, Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from An Italian Dry Fermented Sausage, Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma Vol. 25, page. 167 -174.
- Dyastuti, E.A., 2012, Pengaruh Penambahan Serbuk Bawang Putih (*Allium sativum*) dan Serbuk Cabai (*Capsium Annuum* L.) terhadap Karakteristik Cincalok, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Pontianak (Skripsi).
- Fardiaz, S., 1992, Analisis Mikrobiologi Pangan, Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Guerra, N.P., Bernardez, P.F., Mendez., J., Cachaldora, P., Castro, L.P., 2006,

Production of Four Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Evaluation as Feed Additives for Weaned Piglets, *Animal Feed Science and Technology*, 134: 89-107.

Holzafel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, 2001, Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganism in food and Nutrition, *The American Journal of Clinical Nutrition*.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003, Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry-Fermented Sausage in Respect of Their Technological and Probiotic Properties, *Meat Sci*, 65, 859-867: A Multivariate Screening Study, *International Dairy Journal*, 18: 81-92.

Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., Paul, L.H., McSweeney and Parente, E., 2007, Acid Production, Proteolysis, Autolytic and Inhibitory Properties of Lactic Acid bacteria Isolated from Pasta Filata Cheeses, *International Dairy Journal* 18, 81-92.

Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A., 2003, *Microbiology*, 6th edition, Mc.Graw-Hill, Boston.

Rahayu, E., dan Purwandhani, S., 2007, Isolasi dan Seleksi *Lactobacillus* yang Berpotensi Sebagai Agensia Probiotik, *Agritech Vol 23*, ISSN 0216-0455.

Rahayu, E., 2001, Potensi Bakteri Asam Laktat di Bidang Industri Pangan, Prosiding Seminar Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia.

Sahingil, D., Isleroglu, H., Yildirim, Z., Akcelik, M., Yildirim, M., 2009, Characterization of *Lactococcin* BZ Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* BZ Isolated from Boza, TUBITAK, *Turk Journal Biol*, 35, 2011, P. 21-33.

Sahnouni, F., Matallah, B.A., Chemlal, D., and Boutiba, Z., 2012, Technological Characterization of Lactic Acid Bacterial isolated from Intestinal microbiota of Marine Fish in the Oran Algeria Coast, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(13), pp. 3125-3133, 9 April, 2012, ISSN 1996-0808.

Surono, I.S., dan Nurani, 2001, *Susu Fermentasi dan Kesehatan*, YAPPMI, Jakarta.

Widhyastuti, H., 2011, Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Makanan Fermentasi Tradisional Cincalok dan Tempoyak, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Pontianak (Skripsi).