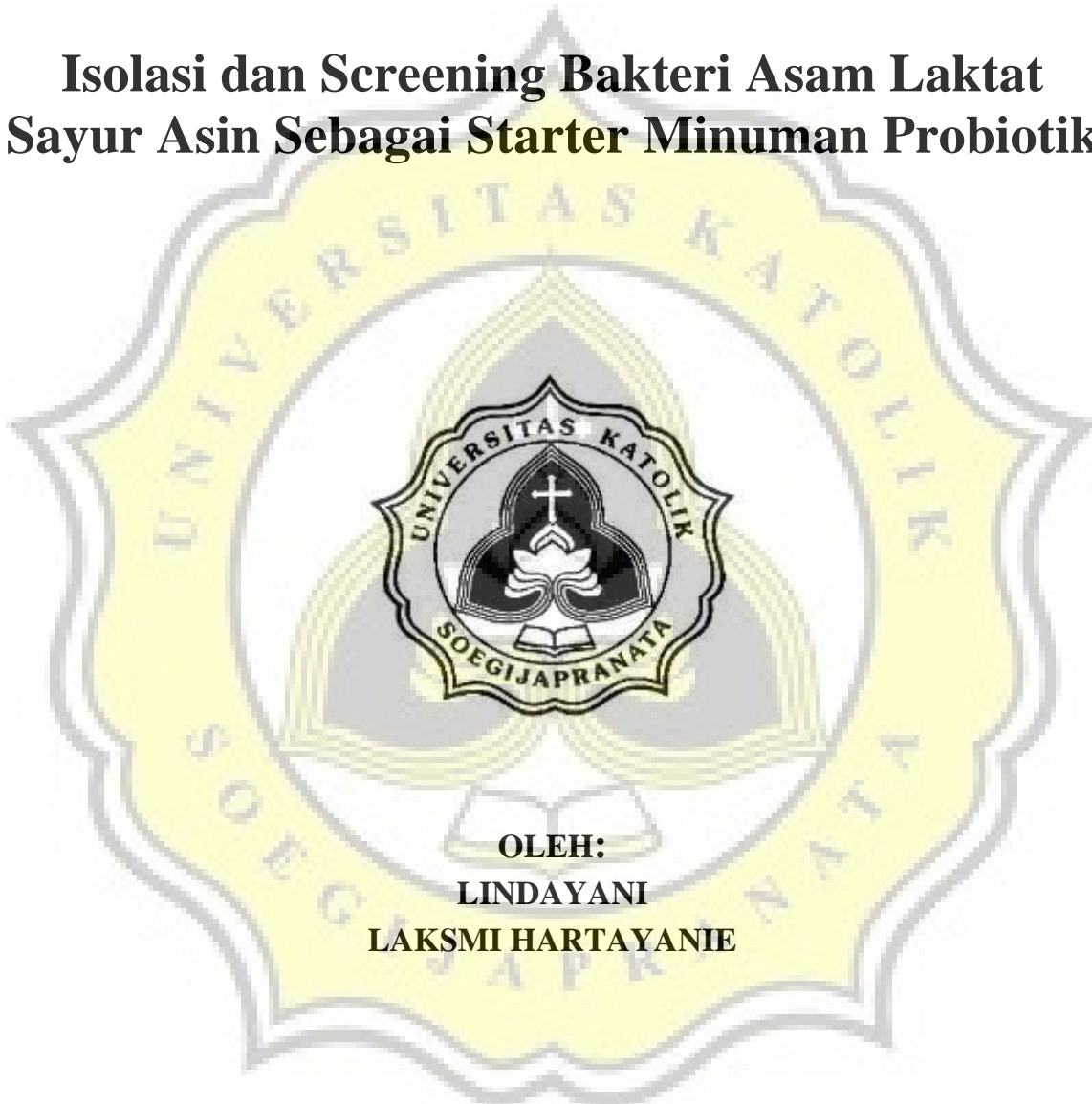


LAPORAN PENELITIAN

Isolasi dan Screening Bakteri Asam Laktat Sayur Asin Sebagai Starter Minuman Probiotik



**OLEH:
LINDAYANI
LAKSMI HARTAYANIE**

**PROGRAM MAGISTER TEKNOLOGI PANGAN
UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA SEMARANG**

2011

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian: **Isolasi dan Screening Bakteri Asam Laktat Sayur Asin Sebagai Starter Minuman Probiotik**

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Lindayani, MP.
- b. NIP : 058.1.1994.153
- c. Fakultas/Jurusan : Program Magister Teknologi Pangan
- d. Alamat : PMTP UNIKA SOEGIJAPRANATA
Jl. Pawiyatan Luhur IV / 1 - Semarang
- e. Telpon/Faks : 024 – 8441555/024 - 8445265
- f. Hp//E-mail : 081578518311/lindayaniyahya@yahoo.com atau
lindayani@unika.ac.id

Anggota Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dra. Laksmi Hartajanie, MP.
- b. NIP : 058311997001
- c. Fakultas/Jurusan : Program Magister Teknologi Pangan
- d. Alamat : PMTP UNIKA SOEGIJAPRANATA
Jl. Pawiyatan Luhur IV / 1 - Semarang
- e. Telpon/Faks : 024 – 8441555/024 - 8445265
- f. Hp//E-mail : 0811278802/laksmi.87@hotmail.com

3. Jangka Waktu Penelitian : `6 bulan

4. Pembiayaan : Rp 4.400.000

Semarang, 16 September 2011

Menyetujui:
Sekretaris PMTP Unika Soegijapranata,

Ketua Tim Peneliti,

Dra.Laksmi Hartajanie, MP.
NPP: 058311997001

Dr. Ir. Lindayani, MP.
NPP: 05811994153

Mengetahui:
Direktur Pasca,

Dr. Ir. A. Rudyanto Soesilo
NPP:

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Minuman probiotik merupakan salah satu bentuk diversifikasi produk pangan kesehatan, mengandung mikroba aktif yang mampu mempengaruhi lingkungan sekitarnya (Koebnick *et al.*, 2003 dan Yoon *et al.*, 2005). Efek kesehatan dalam minuman probiotik disebabkan adanya bakteri asam laktat yang terkandung di dalamnya.

Bakteri asam laktat memiliki keuntungan bagi kesehatan, terutama bagi pencernaan manusia. Berdasarkan beberapa penelitian diketahui bahwa bakteri asam laktat mampu menghambat aktivitas bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Pada penelitian aktivitas antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi dari daging sapi (Al-Allaf *et al.*, 2009), dari susu fermentasi (Savadogo *et al.*, 2004), dan minuman fermentasi tradisional Etiopia (Tadasse *et al.*, 2005).

Sayur asin merupakan salah satu makanan dengan bahan dasar sawi pahit yang diolah melalui proses fermentasi. Penelitian yang dilakukan oleh Lilik Mekar Sari (komunikasi langsung) menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang terdapat pada sayur asin dengan perendaman air kelapa maupun air tajin relatif sama, yaitu *Lactobacillus fermentum*, *L. Plantarum* / *L. curvatus* / *L. casei*, *L. brevis* / *L. buchneri*, *Streptococcus sp.*, dan *Leuconostoc sp.*, kecuali *L. delbrueckii* / *L. jensenii* yang hanya terdapat pada sayur asin dengan perendaman air tajin, dan *L. viridescens* / *L. coprophillus* yang hanya terdapat pada sayur asin dengan perendaman air kelapa.

Metode fermentasi yang terjadi lebih dikenal dengan istilah fermentasi asam laktat, karena selama proses fermentasi, bakteri/kultur yang ada menghasilkan asam laktat. Fermentasi sayur asin berlangsung secara spontan/tanpa ada penambahan inokulum bakteri asam laktat. Fermentasi sayuran memiliki banyak kelebihan dari segi kesehatan, sosial dan ekonomi. Menurut Battcock & Azam-Ali (1998), keuntungan fermentasi sayuran antara lain : (1) mengawetkan bahan pangan; (2) hemat energi; (3) menghilangkan faktor anti-nutrisi, misalnya menurunkan kadar sianida pada ketela; (5) meningkatkan kandungan vitamin, misalnya pada *palm wine* (makanan khas Afrika Selatan) yang memiliki vitamin B12 lebih tinggi daripada buah kelapa.

Pembuatan sayur asin lebih sering menggunakan air kelapa, akan tetapi terkadang air tajin digunakan sebagai pengganti air kelapa (Esti & Sediadi, 2000). Pada umumnya, produsen sayur asin lebih memilih pemakaian air kelapa karena lebih praktis dan ekonomis. Pembuatan sayur asin dengan limbah air kelapa merupakan salah satu upaya mengurangi limbah yang ada. Air kelapa yang merupakan air rendaman sayur asin jarang dimanfaatkan ulang karena rasanya yang asam (sering dibuang). Air rendaman sayur asin mempunyai potensi sebagai media untuk memperoleh bakteri asam laktat. Maka, diperlukan adanya kajian air rendaman sayur asin sebagai *starter* awal untuk memperoleh inokulum bakteri asam laktat yang dapat bermanfaat sebagai *starter* untuk pembuatan minuman probiotik.

1.2. Tujuan Penelitian

- Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang diperoleh dari air rendaman sayur asin.
- Melakukan *screening* terhadap bakteri asam laktat yang telah diidentifikasi untuk memperoleh bakteri asam laktat sebagai *starter* minuman probiotik.



I. TINJAUAN PUSTAKA

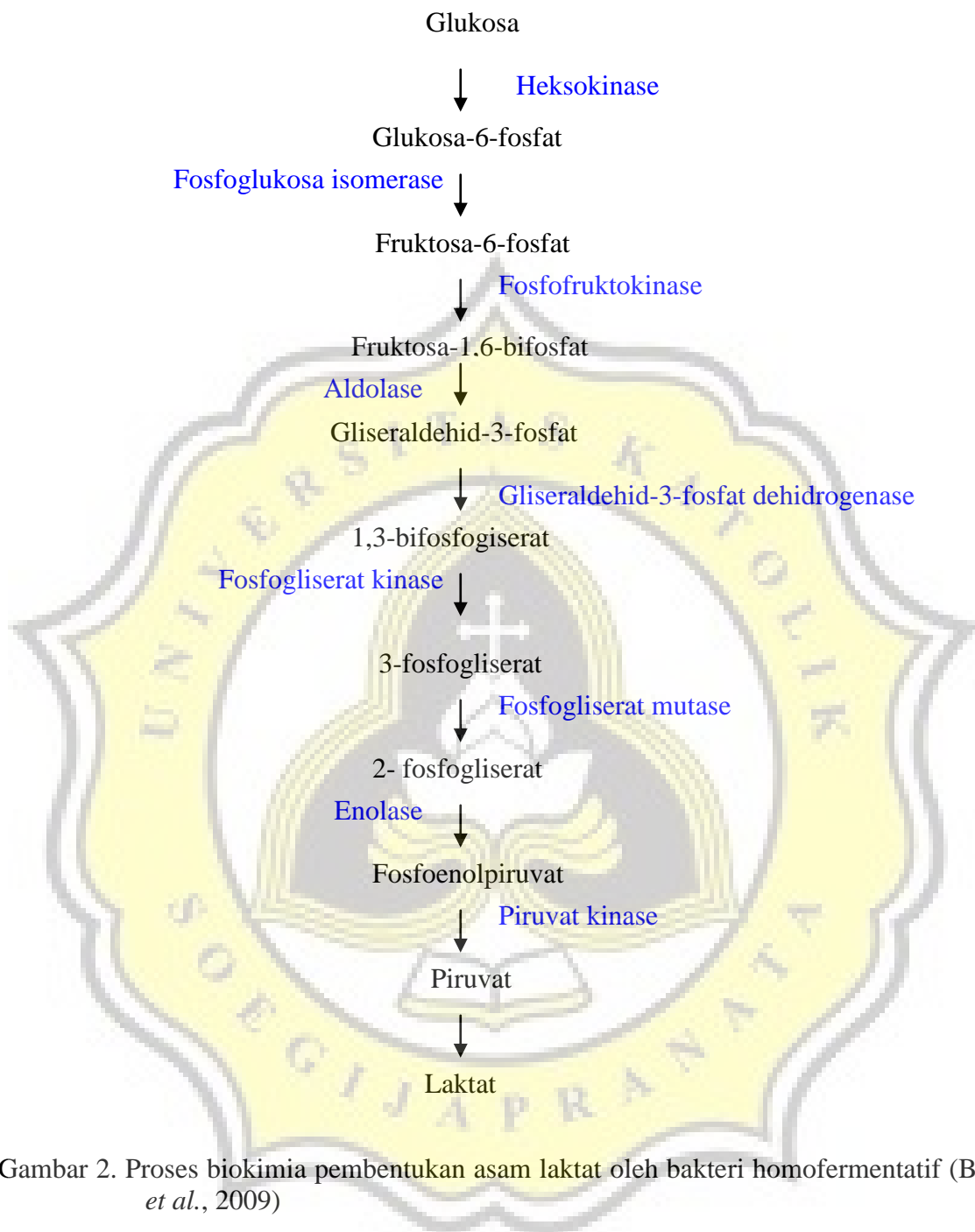
2.1. Manfaat Minuman Probiotik

Minuman probiotik merupakan salah satu jenis minuman yang melibatkan proses fermentasi, memiliki kandungan mikroorganisme yang tetap aktif selama proses penyimpanan. Selain mampu tetap aktif, mikroba yang terdapat dalam minuman probiotik juga harus dapat bertahan hidup terhadap asam lambung dan asam empedu yang terdapat dalam sistem pencernaan manusia (Fuller, 1997 dan Saarela *et al.*, 2000). Lebih lanjut Saarela *et al.* (2000) dan Yavuzdurmaz (2007) menambahkan, mikroorganisme dapat digolongkan sebagai probiotik apabila memiliki karakteristik seperti aman dikonsumsi manusia, memiliki sifat antagonistik terhadap bakteri patogen, memproduksi senyawa antimikrobia, dan memiliki efek kesehatan. Menurut Koebnick *et al.* (2003), minuman probiotik memiliki keuntungan dalam menjaga sistem pencernaan, menekan aktivitas senyawa karsinogenik dalam tubuh, berperan dalam sistem imunologi, dan meningkatkan pemecahan laktosa dalam tubuh. Selain itu, konsumsi minuman probiotik dapat mengurangi kadar kolesterol dalam darah (Yoon *et al.*, 2005).

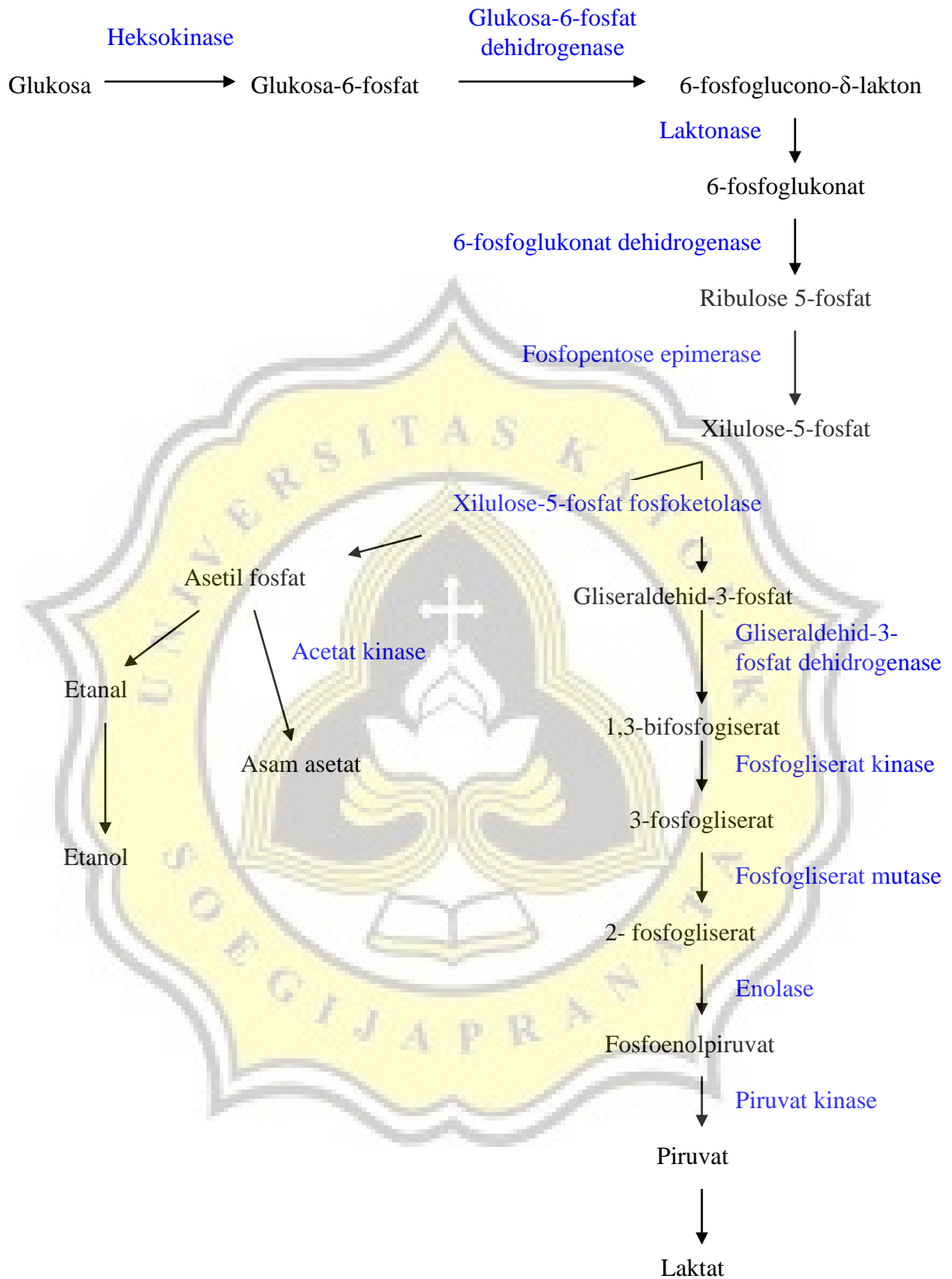
Di dalam saluran pencernaan manusia terdapat mikroflora yang berperan dalam menjaga saluran pencernaan dari mikroorganisme patogen. Bakteri probiotik memiliki kemampuan sama dengan mikroflora dalam sistem pencernaan manusia. Keberadaan bakteri probiotik tidak mempengaruhi mikroflora. Menurut Fuller (1997), organisme probiotik merupakan bagian dari mikroflora yang ada dalam sistem pencernaan.

2.2. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri *chemotrophic* yang memperoleh energi dari senyawa kimia di sekitar lingkungannya dan memproduksi asam laktat (Gambar 1) sebagai hasil dari metabolismenya.



Gambar 2. Proses biokimia pembentukan asam laktat oleh bakteri homofermentatif (Belitz *et al.*, 2009)



Gambar 3. Proses biokimia pembentukan asam laktat oleh bakteri heterofermentatif (Belitz *et al.*, 2009)

Bakteri asam laktat juga menghasilkan senyawa yang mampu menghambat aktivitas mikroba lainnya. Senyawa yang dihasilkan disebut bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa *proteinaceous* yang disintesis oleh bakteri gram positif dan dikeluarkan ke lingkungan (Savadogo *et al.*, 2004; Dimov *et al.*, 2005; Mezaini *et al.*, 2009). Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat bersifat *broad spectrum*, yang berarti hampir semua bakteri patogen dan perusak terhambat oleh keberadaan substansi ini. Efek penghambatan yang ditimbulkan bakteriosin dikarenakan substansi ini merusak membran sel bakteri (Hansen dalam Hui *et al.* 2004). Substansi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat sangat bermanfaat bagi perkembangan industri pangan hingga saat ini. Beberapa bakteriosin yang sudah diuji keamanannya (misal nisin dan leukosin) dan digunakan sebagai agen pengawet makanan.

2.3. Sayur Asin Sebagai Hasil Fermentasi Sawi Pahit

Sayur asin merupakan hasil olahan dari tanaman sawi pahit (*Brassica juncea* (L.) Czernjaew) (Gambar 4). Sawi pahit merupakan tanaman tahunan (perennial), termasuk dalam familia *Brassicaceae* (Duke, 1983). Tanaman sawi merupakan salah satu hasil pertanian utama di Indonesia (Johnson *et al.*, 2008). Komposisi nutrisi dalam 100 gram sawi pahit dapat dilihat dalam Tabel 1.



Gambar 4. Sawi pahit (*Brassica juncea* (L.) Czernjaew) (dokumenasi pribadi)

Tabel 1. Komposisi Sawi Pahit (*Brassica juncea* (L.) Czernjaew) (per 100 g)

Komponen	Kadar
Kalori	24 kal
Air	91,8 g
Protein	2,4 g
Lemak	0,4 g
Karbohidrat total	4,3 g
Serat	1 g
Abu (<i>ash</i>)	1,1 g
Kalsium	160 mg
Fosfat	48 mg
Besi	2,7 mg
Natrium	24 mg
Kalium	297 mg
β -karoten	1825 μ g
Thiamin (vitamin B ₁)	0,06 mg
Riboflavin (vitamin B ₂)	0,14 mg
Niacin (asam nikotinat)	0,8 mg
Asam askorbat	73 mg

Sumber : Duke, 1983

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa kandungan air sawi pahit adalah 91,8g/100g. Hal ini menyebabkan sayuran sawi mudah rusak. Untuk mengurangi kerusakan, maka cara yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan metode fermentasi. Metode fermentasi sawi lebih dikenal dengan istilah fermentasi asam laktat, karena bakteri/kultur yang ada menghasilkan asam laktat. Dalam proses fermentasi sayur asin, tidak diperlukan adanya penambahan inokulum. Menurut Hansen dalam Hui *et al.* (2004), inokulasi mikroba terkadang tidak diperlukan dalam suatu proses fermentasi apabila mikroba yang diperlukan sudah ada pada bahan baku. Josephsen & Jespersen dalam Hui *et al.* (2004) menambahkan bahwa sebagian besar habitat natural bakteri asam laktat, khamir, dan jamur adalah pada sayuran (tumbuhan).

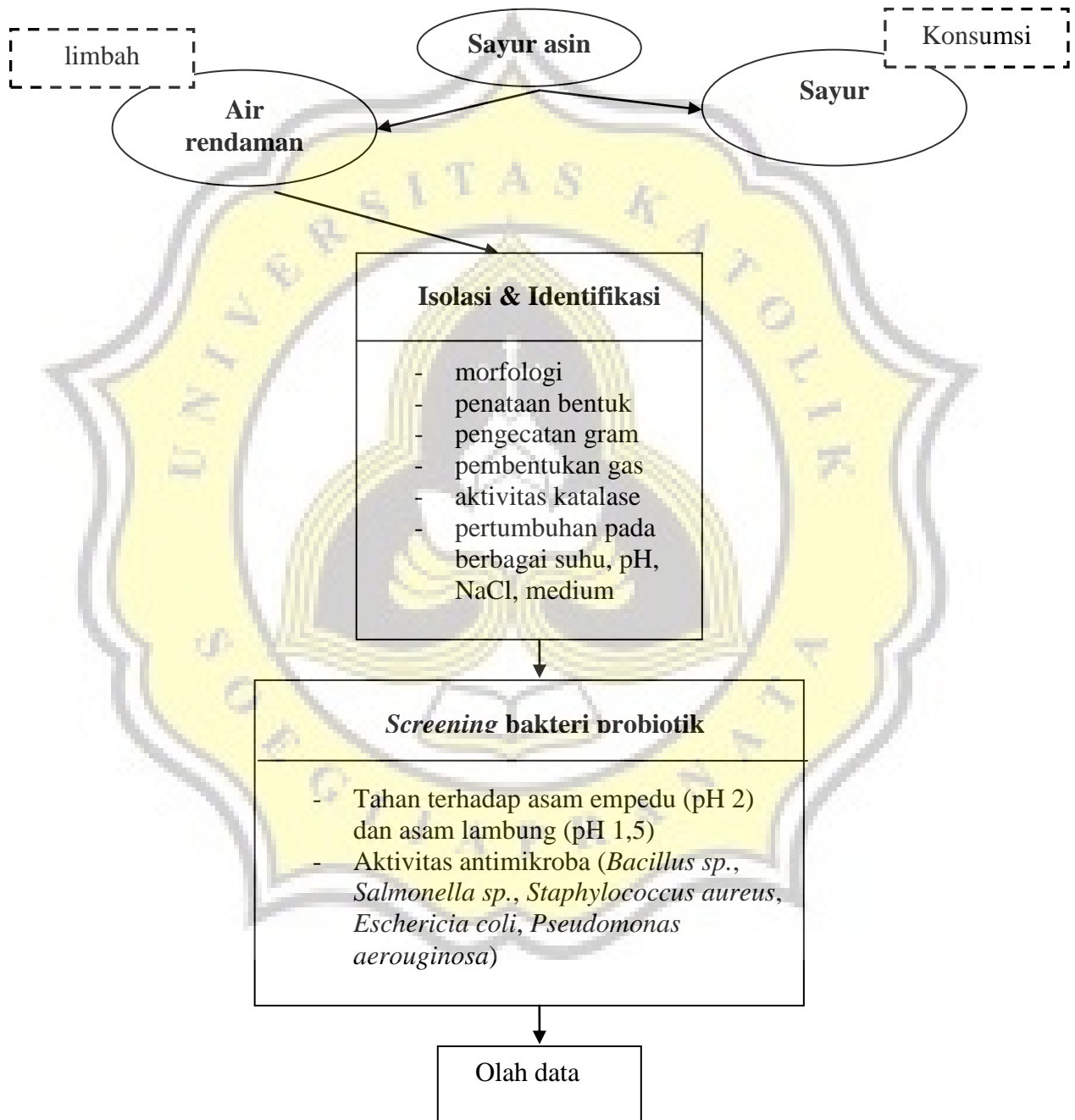
Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan sayur asin adalah sawi pahit, air kelapa atau air tajin, dan garam. Kandungan karbohidrat total dalam 100 gram sawi pahit hanya sekitar 4,3 gram (Tabel 1), sehingga perlu tambahan sumber energi lain yang dapat berasal dari air kelapa maupun air tajin. Air kelapa mencapai 25% berat sebutir buah kelapa. Komposisi nutrisi dalam air kelapa adalah air (95%), karbohidrat (4 %), lemak (0,1 %),

kalsium (0,02 %), fosfat (0,01 %), besi (0,5 %), dan berbagai asam amino, vitamin C, vitamin B kompleks dan garam mineral lainnya (Helmi, 2008). Penambahan garam digunakan untuk membentuk tekstur sawi menjadi lunak karena terjadinya pengeluaran cairan dari sawi (peristiwa osmosis) dan menyediakan lingkungan hidup bagi bakteri asam laktat (Battcock & Azam-Ali, 1998 dan Apriyanto, 1984 dalam Astuti, 2006). Lebih lanjut Battcock & Azam-Ali (1998) menjelaskan bahwa jumlah garam yang biasa ditambahkan adalah sekitar 3% (b/b).



II. MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata Semarang. Diagram penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir penelitian isolasi dan *screening* bakteri asam laktat

3.2. Materi

3.2.1. Bahan

Sawi pahit (*Brassica juncea* (L.) Czernjaew) dan air kelapa (*Cocos nucifera* L.) diperoleh dari pasar Gang Baru Semarang, medium agar dan *broth* MRS Merck (Lampiran 1), medium agar Mueller-Hinton Merck (Lampiran 1), medium *broth* kaldu laktosa Merck (Lampiran 1), medium nutrien agar Merck (Lampiran 1), indikator merah fenol (Lampiran 2), alkohol 95 %, larutan NaOH, larutan HCl, reagensia pengecatan gram (larutan ungu kristal, larutan iodium gram, alkohol / etanol 95 %, larutan safranin) (Lampiran 2), larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%, akuades steril, garam empedu Merck, dan sampel bakteri patogen (*Bacillus sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, dan *Pseudomonas aerouginosa*) dari Universitas Katolik Soegijapranata Semarang.

3.2.2. Alat

Cawan petri, tabung reaksi, mikroskop, gelas obyek, jarum ose, batang gelas melengkung (*hockey stick glass*), seperangkat alat pengecatan gram (bak pewarna, pincet, botol pijit), spektrofotometer shimadzu, inkubator, pipet ukur – mikropipet, *autoclave*, *sterile filter discs*, dan tabung Durham.

3.3. Metode

3.3.1. Pembuatan Sayur Asin

Sawi pahit dicuci bersih lalu ditiriskan. Seberat 150 g sawi pahit diberi 4,5 g garam (penambahan garam sebanyak 3 % (b/b)), kemudian dicampur hingga permukaan sawi menjadi lunak. Setelah itu, sawi direndam dengan air kelapa hingga semua bagian sayur sawi tenggelam dalam wadah plastik dan ditutup rapat. Proses fermentasi berlangsung sekitar 8 hari pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$) (Puspito & Fleet, 1985 yang dimodifikasi).

3.3.2. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat diisolasi dari air rendaman sayur asin. Sebanyak 0,1 ml air rendaman diratakan di atas medium agar MRS (metode *spread plate*). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24-48 jam (Savadogo *et al.*, 2004; Tadesse *et al.*, 2005; Al-Allaf *et al.*, 2009). Setiap koloni yang terbentuk diamati dan diidentifikasi berdasarkan morfologi, reaksi pengecatan gram, pembentukan gas, pengujian katalase, dan pertumbuhan bakteri pada berbagai pH, suhu, dan medium (Lihat 3.2.2.1 sampai dengan 3.2.2.5), kemudian penamaan taksonomi dilakukan menggunakan Bergey's manual of Determinative Bacteriology (Buchanan & Gibbons, 1974). Masing-masing koloni yang teridentifikasi ditumbuhkan kembali dalam medium *broth* MRS. Inkubasi pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

3.3.2.1. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Morfologi

Identifikasi isolat bakteri asam laktat berdasarkan bentuk (*coccus*, *rod-shape*, *coccobacillus*) dan penataan bentuk (tunggal, berpasangan, rantai) dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop (Buchanan & Gibbons, 1974).

3.3.2.2. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Reaksi Pengecatan Gram

Isolat bakteri asam laktat dioleskan pada gelas obyek, kemudian diberi 2 tetes larutan ungu kristal dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, sisa larutan ungu kristal dibuang dan gelas obyek dibilas menggunakan akuades. Pengecatan dilanjutkan dengan larutan iodium gram selama 3 menit, dan dibilas menggunakan akuades. Setelah itu, dilakukan pemucatan menggunakan alkohol 95% setetes demi setetes selama 20 detik, kemudian bilas dengan akuades. Pengecatan terakhir dilakukan menggunakan larutan safranin selama 1 – 2 menit,

dan dibilas dengan akuades. Pengamatan warna yang diserap oleh bakteri asam laktat dilakukan dengan pengamatan mikroskop (Madigan *et al.*, 2003).

3.3.2.3. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Pembentukan Gas

Biakan inokulum dari medium MRS dipindahkan ke medium kaldu laktosa dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C. Inokulum baru ditumbuhkan dalam medium kaldu laktosa yang sudah diberi indikator merah fenol. Dalam tabung pengujian dimasukkan tabung durham dalam posisi terbalik. Apabila warna medium berubah menjadi kuning, berarti inokulum membentuk asam dari fermentasi laktosa. Pengamatan pembentukan gas dilakukan dengan mengamati gelembung dalam tabung durham. Apabila terdapat gelembung gas berarti dalam proses fermentasi terbentuk gas (Madigan *et al.*, 2003).

3.3.2.4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Pengujian Aktivitas Katalase

Sebanyak 2 tetes larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% diteteskan pada gelas obyek bersih, kemudian ditambahkan inokulum bakteri asam laktat. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen (Madigan *et al.*, 2003).

3.3.2.5. Pertumbuhan Bakteri Pada Berbagai pH, Suhu, Dan Medium

Sebanyak 2 ose inokulum diamati pertumbuhannya pada medium MRS yang sudah dimodifikasi pH, tingkat salinitas, dan komposisi sumber karbon. Pertumbuhan juga diamati pada perlakuan suhu serta penggantian medium (Buchanan & Gibbons, 1974).

3.3.3. Screening Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik

3.3.3.1. Kemampuan Bertahan Terhadap pH rendah

Kultur bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam medium MRS broth yang memiliki pH 7, 3, dan 2 dengan larutan HCl 1M atau larutan NaOH 0,5 M. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 3 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan setiap jam dengan metode spektrofotometri (λ 620 nm) (Yavuzdurmaz, 2007 yang dimodifikasi dan Asraf *et al.*, 2009 yang dimodifikasi).

3.3.3.2. Kemampuan Bertahan Terhadap Garam Empedu

Kultur bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam medium MRS broth yang mengandung 0,3%, 0,5%, dan 1% (b/v) garam empedu Merck. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 4 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan setiap jam dengan metode spektrofotometri (λ 620 nm) (Yavuzdurmaz, 2007 yang dimodifikasi dan Asraf *et al.*, 2009 yang dimodifikasi).

3.3.3.3. Aktivitas Antimikroba

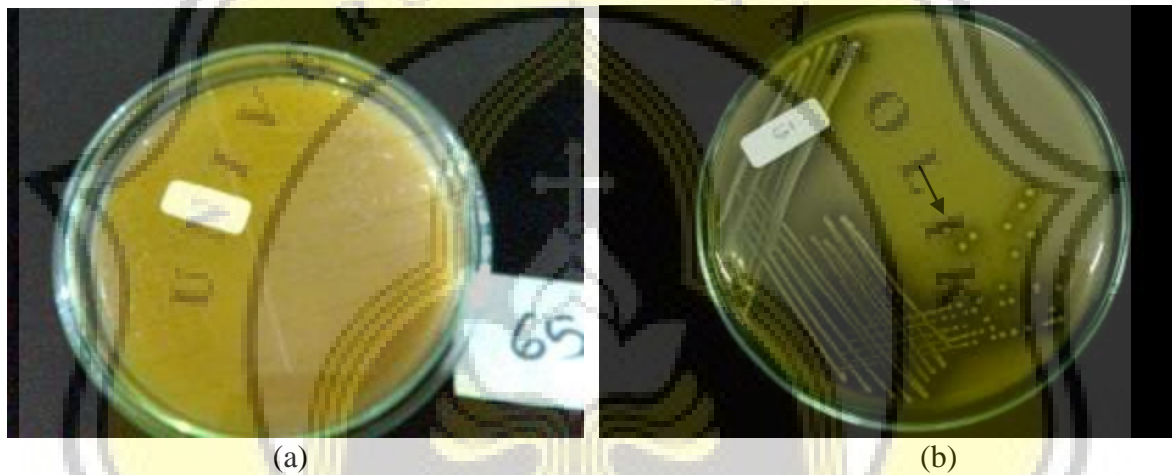
Aktivitas antimikroba ditentukan dengan pengukuran zona terang / hambat yang diadaptasi dari metode yang dilakukan Tadesse *et al.* (2005). Bakteri patogen ditumbuhkan dalam medium nutrisi agar (NA) 24 jam sebelum pengujian aktivitas antimikroba dilakukan. Sebanyak 0,1 ml bakteri patogen ditumbuhkan pada medium agar Muller-Hinton dan diinkubasi 12-14 jam pada suhu 37 °C. *Sterile filter disc* yang telah dicelupkan dalam medium *broth* MRS selama 42 jam, diletakkan pada cawan petri berisi bakteri patogen. Cawan petri disimpan pada suhu 4 °C selama 3 jam untuk mendukung pertumbuhan / difusi bakteri pada medium. Setelah itu, inkubasi dilakukan selama 14-16 jam pada suhu 37 °C. Pengukuran zona terang yang terbentuk dilakukan menggunakan alat ukur penggaris.

3.3.4. Analisa Data

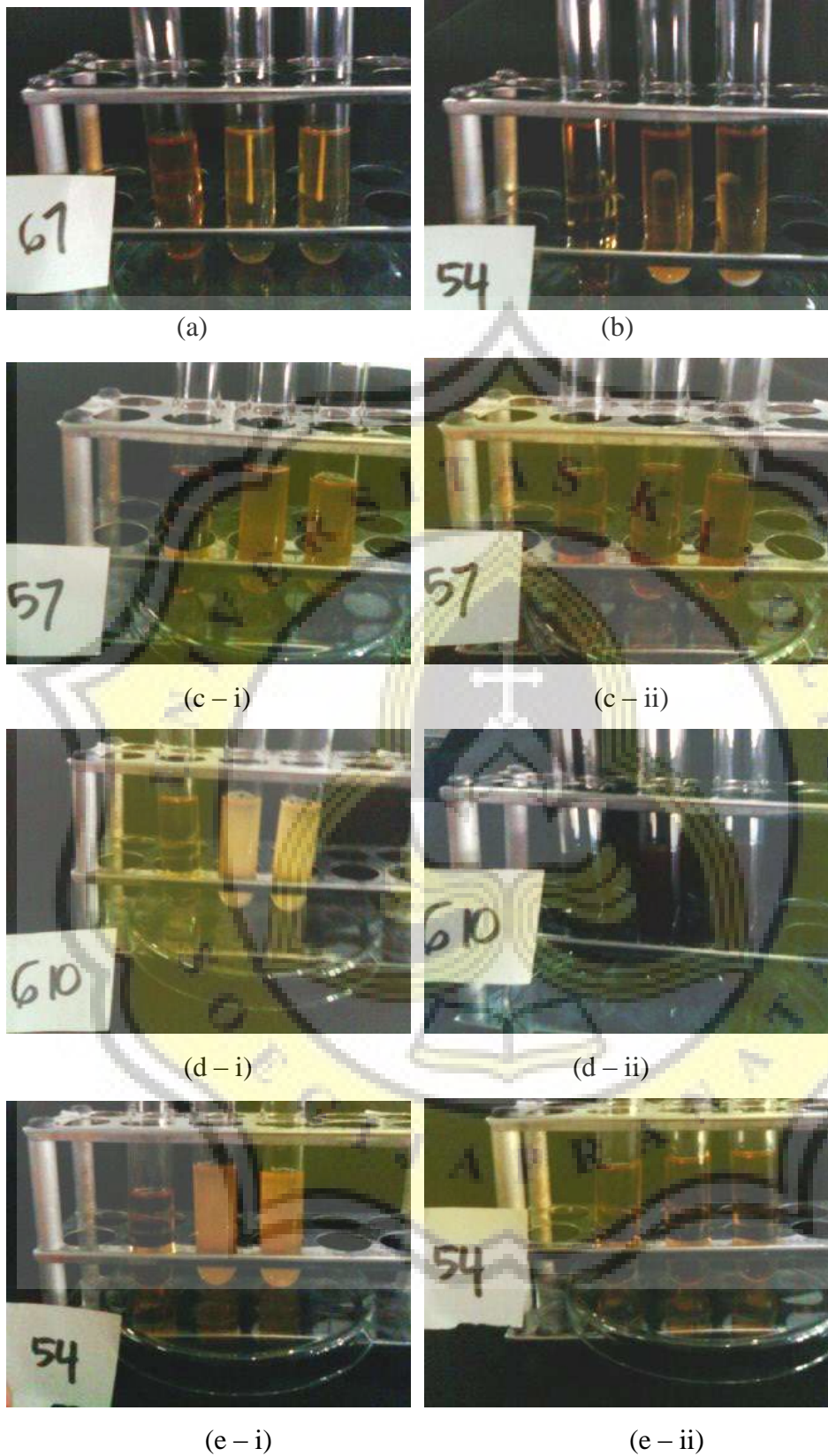
Data pertumbuhan mikroorganisme ditampilkan dalam bentuk grafik pertumbuhan dengan program Microsoft Excell 2003. Analisa data aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan SPSS, di mana jarak zona penghambatan dibandingkan antar bakteri asam laktat menggunakan *One Way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 5% (Walpole & Myers, 1985).

III. HASIL PENELITIAN

Pada hasil penelitian diperoleh bahwa dari air rendaman sayur asin ditemukan 28 koloni yang terdiri atas 25 isolat bakteri termasuk dalam genus *Lactobacillus* sedangkan 3 isolat bakteri yang lain tidak termasuk bakteri asam laktat karena tidak membentuk zona bening pada media MRS yang mengandung CaCO_3 (Gambar 6). Identifikasi genus berdasarkan morfologi, pewarnaan gram, aktivitas katalase, kemampuan tumbuh pada suhu 10°C dan 45°C , kemampuan tumbuh pada konsentrasi NaCl 6,5% dan 18% serta pH 4,4 dan 9,6 (Gambar 7). Hasil tes biokimia identifikasi bakteri asam laktat dapat dilihat pada Table 2.



Gambar 6. Koloni yang tidak membentuk zona bening pada media MRS dengan CaCO_3 (a) dan koloni bakteri asam yang membentuk zona bening (panah) (b)



Gambar 7. Penentuan genus bakteri asam laktat berdasarkan: sifat *non-motil* (a), pembentukan gas (b), kemampuan tumbuh pada berbagai suhu 10°C (c-i) dan 45°C (c-ii), pH 4,4 (d-i) dan 9,6 (d-ii), serta NaCl 6,5% (e-i) dan 18% (e-ii)

Tabel 2. Hasil tes biokimia identifikasi bakteri asam laktat

Isolat	Katalase	Zona Bening	Motilitas	Bentuk	Gram	Durham	Suhu (°C)		NaCl (%)		pH	
							10	45	6,5	18	4,4	9,6
51	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
52	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
53	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
54	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
55	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
56	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
57	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
58	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
59	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
61	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
62	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
63	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
64	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
65	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
66	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
67	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
68	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
69	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
610	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
71	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
72	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
73	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
74	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
75	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
76	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
77	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
81	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-
82	-	+	-	b	+	-	+	-	+	-	+	-

Keterangan : " b " = bakteri bentuk batang / *bacillus* (b)
 : " * " = tidak dilakukan pengujian
 : " - " = isolat tidak tumbuh (media bening)
 : " + " = isolat tumbuh (media keruh)

4.2. *Screening* Bakteri Asam Laktat

4.2.1. Kemampuan Bertahan pada pH Rendah

Proses *screening* dilakukan dengan menguji kemampuan hidup bakteri pada lingkungan pH rendah dengan memodifikasi pH media sesuai dengan pH saluran pencernaan manusia, yaitu pH 3 (Chou & Weimer, 1999 dalam Yavuzdurmaz, 2007) selama kurang lebih 2 - 3 jam (Banker, 2002 dalam Tharakan, 2008; Chou & Weimer, 1999 dalam Yavuzdurmaz, 2007). Pengujian kemampuan hidup bakteri asam laktat pada pH rendah dilakukan pada pH 7 dan 3 dengan penghitungan koloni yang terbentuk pada jam ke-0, ke-1,5, dan ke-3. Kemampuan bertahan hidup di pH rendah ditunjukkan dari kemampuan isolat membentuk koloni dengan metode *pour plate* (Gambar 8). Isolat 51, 53, 68, 69, 73, 74, 75, dan 77 menunjukkan kemampuan bertahan di pH rendah lebih dari isolat yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa isolat – isolat mampu tumbuh pada lingkungan sulit (*stressful environment*). Jumlah koloni yang stabil selama 3 jam, seperti isolat 52, 56, 57, 58, 61, 67, 72, dan 82. (Tabel 3).



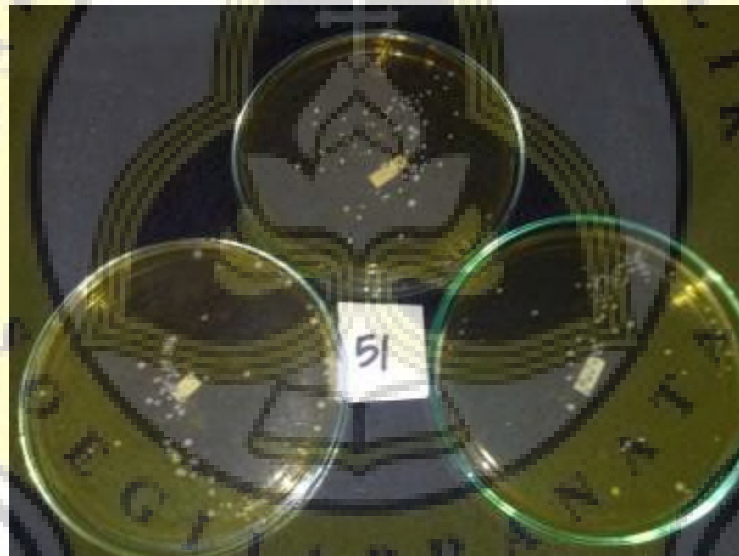
Gambar 8. Kemampuan bakteri asam laktat bertahan hidup pada pH rendah (pH 3) yang ditunjukkan dengan pembentukan koloni (sampel no. 77)

Tabel 3. Kemampuan Bakteri Asam Laktat Bertahan Hidup Pada pH 7 dan 3 (log CFU/ml)

Isolat	pH	Jumlah koloni (log CFU/ml) padawaktu pengukuran (jam)		
		0	1,5	3
51	7	9,34	9,54	9,88
	3	9,52	9,63	9,80
52	7	9,81	9,83	9,45
	3	9,11	9,34	9,26
53	7	9,70	9,32	9,15
	3	9,36	9,46	9,53
54	7	9,64	9,89	9,98
	3	9,30	9,15	9,08
55	7	9,46	9,73	10,00
	3	9,84	8,85	8,95
56	7	10,18	10,22	10,28
	3	9,18	9,20	9,08
57	7	9,41	9,71	9,70
	3	8,60	9,00	9,00
58	7	9,59	9,83	9,97
	3	8,30	8,48	8,00
59	7	9,89	9,40	9,51
	3	9,20	8,60	8,30
61	7	9,70	9,64	9,30
	3	9,23	9,11	9,00
64	7	8,95	8,78	9,00
	3	9,69	8,48	8,48
66	7	8,78	8,78	8,78
	3	9,23	8,30	8,30
67	7	10,46	10,43	10,00
	3	9,72	9,64	9,64
68	7	9,67	9,75	10,19
	3	8,00	9,08	9,20
69	7	10,05	9,67	9,60
	3	8,85	9,56	9,58
610	7	9,00	8,70	8,78
	3	9,43	8,90	8,90
71	7	9,32	9,15	8,60
	3	9,00	9,08	8,70
72	7	9,59	9,65	9,97
	3	9,53	9,34	9,43
73	7	9,74	9,74	9,84
	3	8,95	9,04	9,08
74	7	10,08	10,04	9,59
	3	8,60	9,34	9,58
75	7	9,49	9,32	9,34
	3	8,78	9,30	9,28
76	7	10,31	10,13	10,08
	3	9,93	9,43	9,51
77	7	10,20	9,86	9,60
	3	9,62	9,68	9,81
81	7	10,02	9,94	9,51
	3	9,30	8,70	8,70
82	7	9,34	8,90	8,60
	3	9,04	9,04	9,00

4.2.2. Kemampuan Bertahan Hidup terhadap Garam Empedu

Konsentrasi garam empedu dalam saluran pencernaan manusia berkisar 0,3 % (w/v) (Prasad *et al.*, 1998 dalam Yavuzdurmaz, 2007), dengan waktu tinggal makanan di dalam usus kecil diperkirakan selama 2,5 – 4 jam (Yun *et al.*, 1996 dalam Tharakan, 2008; Prasad *et al.*, 1998 dalam Yavuzdurmaz, 2007), maka kondisi ini diaplikasikan ke pengujian kemampuan bertahan hidup bakteri asam laktat pada lingkungan yang mengandung garam empedu. Isolat – isolat yang bertahan hidup pada pH 3 selama 3 jam, diuji kemampuan bertahan hidupnya pada lingkungan yang mengandung garam empedu. Kemampuan bertahan hidup bakteri ditunjukkan dari kemampuan pembentukan koloni (Gambar 9). Tabel 4 menunjukkan ke-25 isolat mampu tumbuh pada lingkungan dengan konsentrasi garam empedu 0,3% hingga 1% selama 4 jam.



Gambar 9. Kemampuan bakteri asam laktat bertahan hidup pada lingkungan dengan garam empedu (0,5%) yang ditunjukkan dengan pembentukan koloni (sampel no. 51)

Tabel 4. Kemampuan Isolat Bakteri Asam Laktat Bertahan Hidup Pada Lingkungan yang Mengandung Garam Empedu 0,3%. 0,5%, dan 1% (log CFU/ml)

isolat	Garam empedu (%)	Jumlah koloni (log CFU/ml) pada waktu pengukuran (jam)		
		0	2	4
51	0,3	9,68	9,65	10,10
	0,5	9,81	9,88	10,05
	1	9,34	10,15	10,46
52	0,3	9,64	9,65	10,03
	0,5	9,64	9,57	9,67
	1	9,38	10,07	10,47
53	0,3	9,51	9,61	9,79
	0,5	9,41	9,48	9,67
	1	9,20	9,20	9,75
54	0,3	9,54	9,59	9,88
	0,5	9,64	9,61	10,06
	1	9,23	9,62	10,16
55	0,3	9,40	9,49	10,11
	0,5	9,59	9,43	9,64
	1	9,15	9,62	10,13
56	0,3	9,60	9,43	9,72
	0,5	9,45	9,45	9,82
	1	9,28	9,26	9,80
57	0,3	9,08	9,54	10,01
	0,5	9,49	9,57	9,78
	1	8,95	9,46	9,91
58	0,3	9,58	9,56	9,69
	0,5	9,23	9,20	9,61
	1	8,30	9,08	9,72
59	0,3	9,32	9,18	9,32
	0,5	9,34	9,34	9,41
	1	8,95	9,11	8,90
61	0,3	9,15	9,36	9,87
	0,5	9,43	9,49	9,60
	1	8,78	8,85	9,43
64	0,3	8,30	8,78	9,30
	0,5	8,00	8,00	8,00
	1	9,00	9,40	10,02
66	0,3	8,78	9,15	9,18
	0,5	8,30	8,95	8,78
	1	8,60	8,60	8,30
67	0,3	9,45	9,62	10,07
	0,5	9,67	9,66	9,97
	1	9,15	9,68	10,15
68	0,3	9,46	9,62	9,71
	0,5	9,64	9,34	9,65
	1	9,38	9,52	10,21

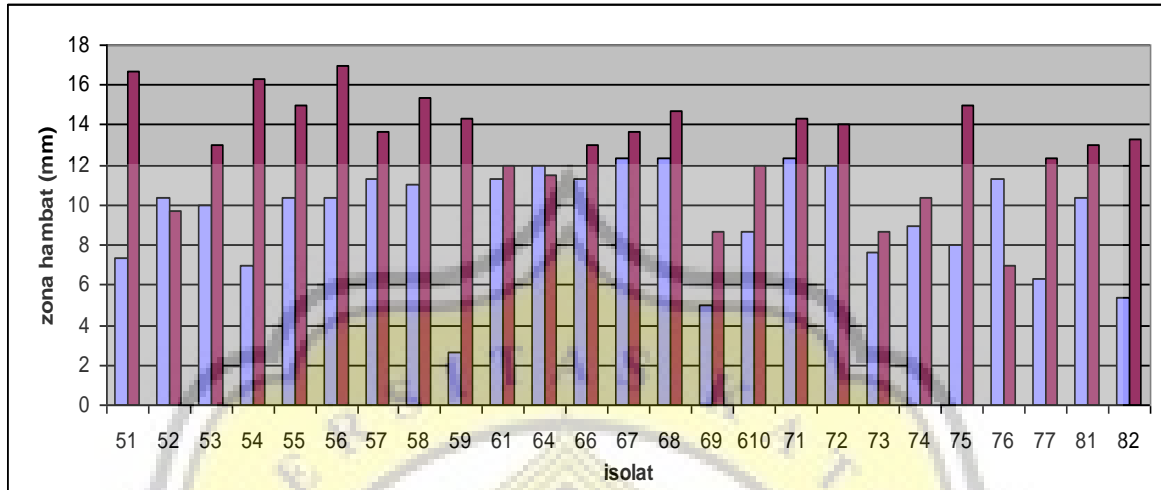
Lanjutan Tabel 4

isolat	Garam empedu (%)	Jumlah koloni (log CFU/ml) pada waktu pengukuran (jam)		
		0	2	4
69	0,3	9,81	9,93	10,43
	0,5	8,85	9,23	9,30
	1	9,48	9,34	10,01
610	0,3	8,30	8,70	8,95
	0,5	8,95	8,95	9,15
	1	8,30	8,30	9,00
71	0,3	8,30	8,30	8,30
	0,5	9,11	8,95	9,08
	1	8,30	8,48	8,70
72	0,3	9,30	9,61	10,03
	0,5	9,23	9,41	9,54
	1	9,23	9,41	10,10
73	0,3	9,49	9,58	9,95
	0,5	9,38	9,61	9,71
	1	9,57	9,43	9,93
74	0,3	9,11	9,08	9,92
	0,5	9,28	9,40	9,64
	1	8,95	9,20	9,92
75	0,3	8,95	9,00	8,90
	0,5	9,15	9,43	9,30
	1	8,48	8,30	8,70
76	0,3	9,57	9,72	10,19
	0,5	9,54	9,71	9,92
	1	9,34	9,28	9,45
77	0,3	9,94	9,85	10,10
	0,5	9,38	9,52	9,61
	1	8,30	8,48	8,00
81	0,3	9,04	9,18	9,95
	0,5	9,00	8,70	8,90
	1	8,48	8,30	8,48
82	0,3	9,61	9,70	10,05
	0,5	8,60	8,00	8,30
	1	8,85	8,30	8,85

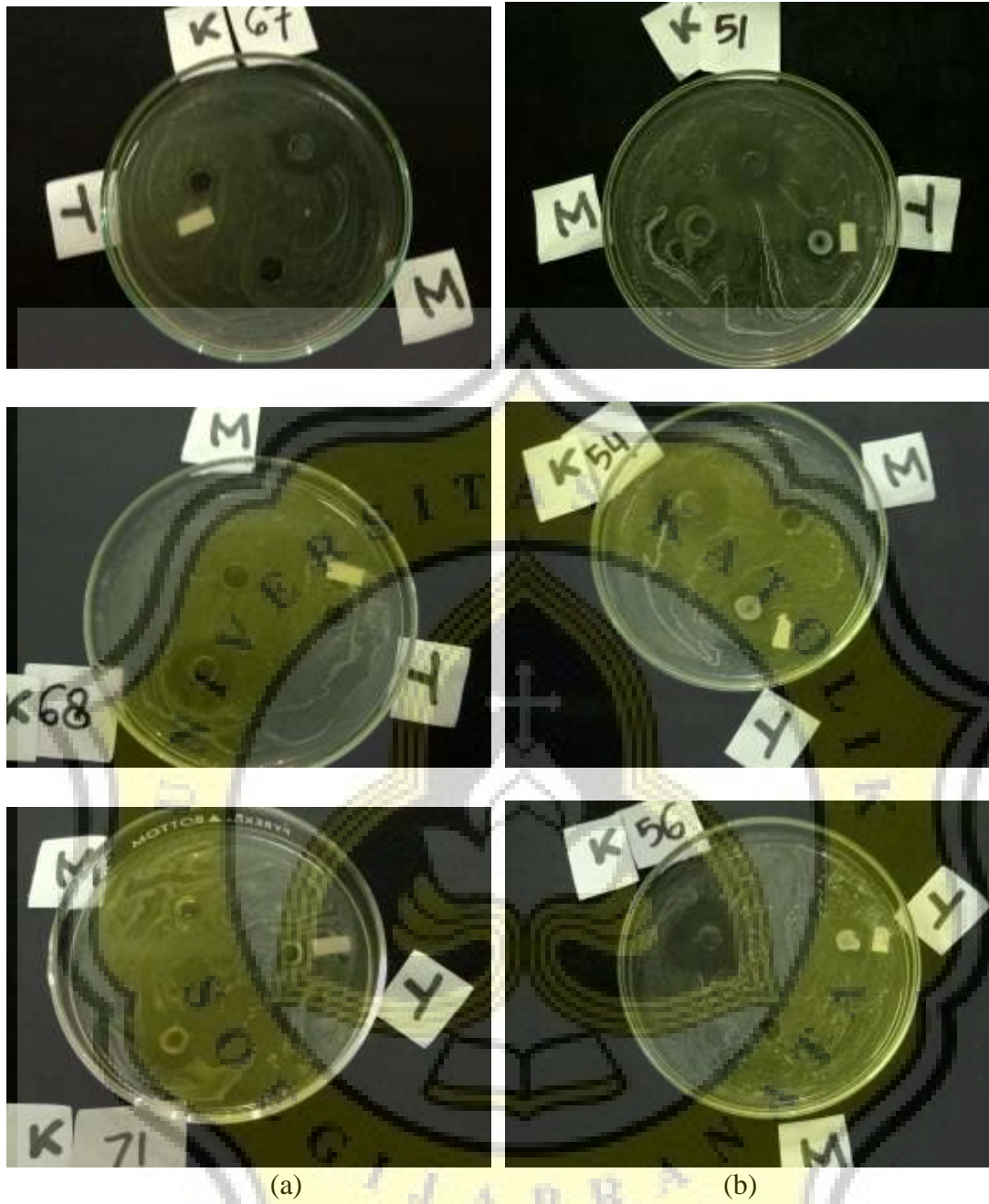
4.2.3. Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat diketahui bahwa 25 isolat bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghambat terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Isolat 51, 54, dan 56 memiliki daya hambat yang kuat terhadap *S. aureus*, dan daya hambat yang paling kuat dari ketiga isolat tersebut adalah isolat 56, yaitu 17 mm. Isolat 67, 68, dan 71

memiliki daya hambat yang kuat terhadap *E. coli*, yaitu 12,33 mm (Gambar 10). Daya hambat isolat diukur dari diameter zona bening di sekeliling sumur (Gambar 11).



Gambar 10. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat terhadap *Escherichia coli* (■) dan *Staphylococcus aureus* (■)



Gambar 11. Zona hambat isolat yang memiliki daya hambat yang kuat terhadap *E. coli* terdapat pada isolat 67, 68, dan 71 (12,33mm) (a) dan *S. aureus* pada isolat 51 (16,67mm), 54 (16,33mm), dan 56 (17 mm) (b)

4.3. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dengan API 50 CHL

Isolat sejumlah 25 yang diidentifikasi memiliki karakteristik probiotik yang baik, antara lain mampu bertahan hidup pada pH rendah, bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung garam empedu, dan memiliki aktivitas antibakteri. Isolat 67, 68, dan 71 memiliki daya hambat yang tinggi terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, oleh sebab itu ketiga isolat dipilih untuk identifikasi lebih lanjut hingga ke tingkat spesies menggunakan API 50 CHL.

API 50 CHL adalah *test kit* yang digunakan untuk identifikasi genus *Lactobacillus* hingga ke tingkat spesies. *Test kit* tersusun atas 49 jenis gula (49 *tube*) yang selanjutnya akan difermentasi oleh isolat yang akan diidentifikasi. Apabila isolat yang diuji mampu memfermentasi sumber gula dan menghasilkan asam, maka indikator bromkresol ungu akan mengubah warna larutan gula dari ungu menjadi kuning. Hasil pengujian diamati secara kuantitatif (Tabel 5). *Tube* yang berubah warna dari ungu menjadi kuning (Gambar 12-14) menunjukkan hasil positif. Setelah isolat 67, 68, dan 71 diidentifikasi kemampuan fermentasi dengan menggunakan API 50 CHL, dilanjutkan analisa data dengan menggunakan API *software*. Hasil identifikasi bakteri asam laktat yang diperoleh adalah *Lactobacillus plantarum* 1 dan *Lactobacillus pentosus*.

Tabel 5. Hasil identifikasi fermentasi berbagai sumber karbon menggunakan API 50 CHL

Tube	Komponen Aktif	Isolat		
		67	68	71
0	CONTROL	-	-	-
1	GLYcerol	-	-	-
2	ERYthritol	-	-	-
3	D-ARAbinose	-	-	-
4	L-ARAbinose	+	+	-
5	D-RIBose	+	+	+
6	D-XYLose	-	+	-
7	L-XYLose	-	-	-
8	D-ADOnitol	-	-	-
9	β -Methyl-D-Xyloside	-	-	-
10	D-GALactose	+	+	+
11	D-GLUcose	+	+	+
12	D-FRUctose	+	+	+
13	D-MaNosE	+	+	+
14	L-SorBosE	+	-	+
15	L-RHAMnose	-	-	-
16	DULcitol	+	-	+
17	INOsitol	-	-	-
18	D-MANnitroL	+	+	+
19	D-SORbitol	+	+	+
20	α -Methyl-D-Mannoside	+	-	+
21	α -Methyl-D-Glucoside	-	+	-
22	N-Acetyl-Glucosamine	+	+	+
23	AMYgdalin	+	+	+
24	ARButin	+	+	+
25	ESCulin	+	+	+
26	SALicin	+	+	+
27	D-CELlobiose	+	+	+
28	D-MALtose	+	+	+
29	D-LACtose	+	+	+
30	D-MELibiose	+	+	+
31	D-Sucrose	+	+	+
32	D-TREhalose	+	+	+
33	INUlin	-	-	-
34	D-MeLeZitose	+	-	+
35	D-RAFfinose	+	+	+
36	Starch	-	-	-
37	GLYcoGen	-	-	-
38	XyLiTol	-	-	-
39	GENTiobiose	+	+	+
40	D-TURanose	-	+	+
41	D-LYXose	-	-	-
42	D-TAGatose	-	-	-
43	D-FUCose	-	-	-
44	L-FUCose	-	-	-
45	D-ARAbitoL	-	-	-
46	L-ARAbitoL	-	-	-
47	potassium GlucoNaTe	-	+	-
48	potassium 2-Keto-Gluconate	-	-	-
49	potassium 5-Keto-Gluconate	-	-	-

Keterangan : " + " = bakteri asam laktat mampu memfermentasi gula

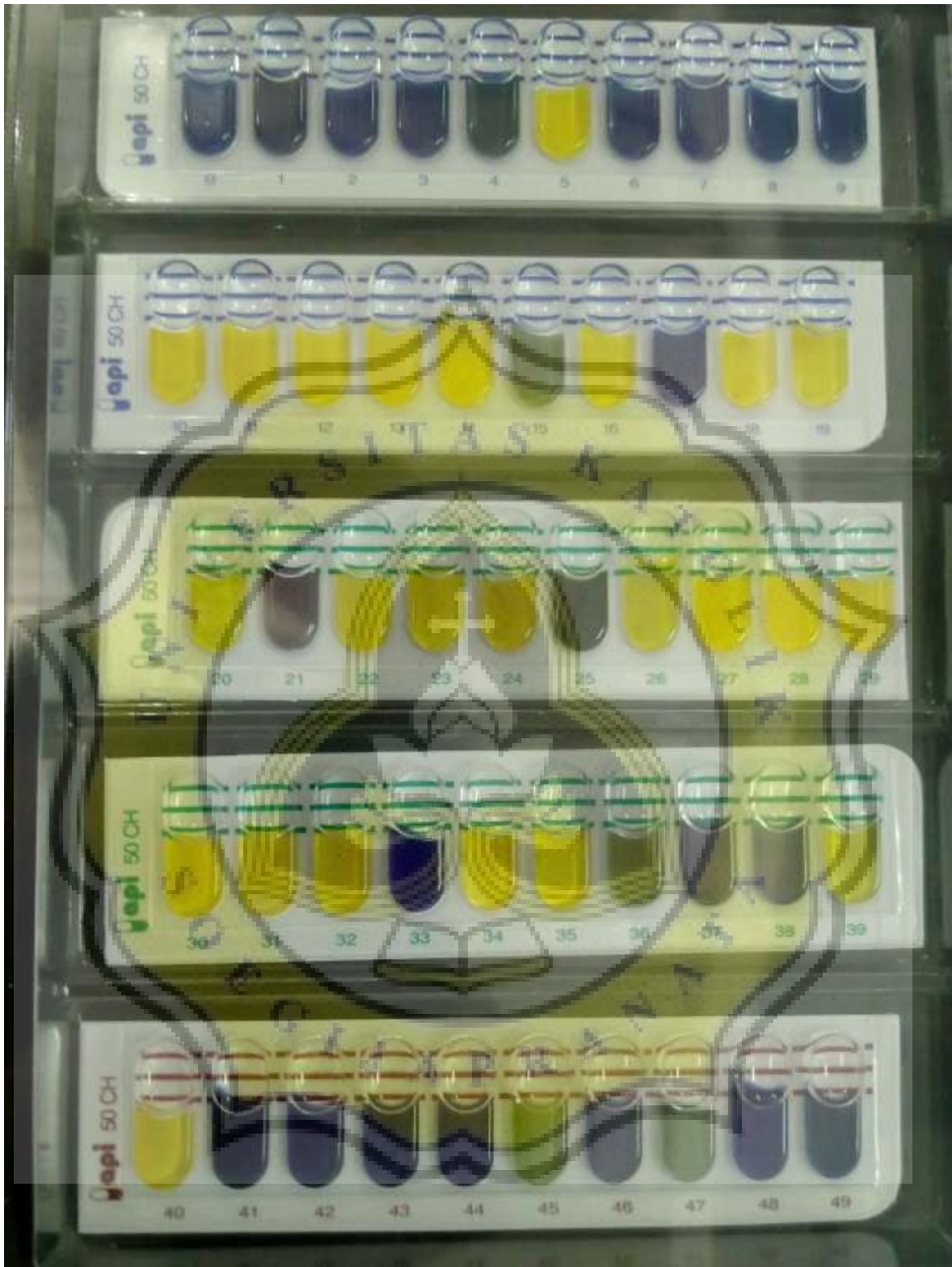
" - " = bakteri asam laktat tidak mampu memfermentasi gula



Gambar 12. Hasil identifikasi isolat 67 menggunakan API 50 CHL



Gambar 13. Hasil identifikasi isolat 68 menggunakan API 50 CHL



Gambar 14. Hasil identifikasi isolat 71 menggunakan API 50 CHL



V. PEMBAHASAN

5.1. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Kultur bakteri asam laktat yang diperoleh berdasarkan identifikasi bakteri asam laktat sejumlah 25 isolat yang menunjukkan karakteristik bakteri asam laktat (Tabel 2) seperti gram positif, berbentuk batang, uji katalase negatif, *non-motil*, dan membentuk zona bening pada media MRS yang mengandung CaCO_3 1% (Gambar 6). Menurut Tadesse *et al.* (2005), bakteri asam laktat memiliki karakteristik tertentu, seperti morfologi sel berbentuk batang atau bulat, gram positif, beberapa menghasilkan gas CO_2 (heterofermentatif) dan beberapa tidak menghasilkan gas CO_2 (homofermentatif).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua isolat bakteri yang diperoleh termasuk dalam genus *Lactobacillus*, dan 25 isolat *Lactobacillus sp.* yang diperoleh termasuk dalam bakteri asam laktat homofermentatif. Pada pengujian tabung Durham (*durham test*), isolat *Lactobacillus sp.* homofermentatif tidak membentuk gelembung gas di dalam tabung Durham (Gambar 7). Genus *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif yang bersifat fakultatif anaerob, berbentuk batang, *non motil*, dan tidak membentuk spora. Bakteri yang termasuk dalam genus ini mampu tumbuh pada suhu 1°C hingga 50°C , dengan kisaran pH lingkungan 3,5–5. Bakteri genus *Lactobacillus* umum ditemukan pada tanaman, sayuran, biji-bijian, makanan berbasis susu, produk daging, dan di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan (Ray & Bhunia, 2008; Karovičová & Kohajdová, 2005).

5.2. Screening Karakteristik Probiotik

Bakteri probiotik harus memiliki beberapa sifat khusus, diantaranya tahan terhadap pH rendah, tahan terhadap garam empedu, mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan manusia, memiliki sifat antagonistik terhadap bakteri patogen, bersifat antimutagenik dan antikarsinogenik (Saarela *et al.*, 2000). Pengujian *screening* bakteri yang memiliki karakteristik probiotik dilakukan dengan pengujian terhadap kemampuan tumbuh pada pH

rendah, kemampuan bertahan terhadap garam empedu, dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen (*E. coli* dan *S. aureus*).

5.2.1. Kemampuan Bertahan pada pH Rendah

Kemampuan hidup pada pH rendah adalah salah satu sifat yang harus dimiliki bakteri probiotik karena bakteri probiotik akan memasuki saluran pencernaan manusia yang memiliki pH rendah. Semua isolat yang diperoleh diuji kemampuan tumbuhnya pada pH 7, hal ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan hidup bakteri asam laktat pada makanan. Semua isolat *Lactobacillus sp.* mampu bertahan hidup di pH 7 (Tabel 3). Hasil pada penelitian ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Klayraung *et al.* (2008), yang menunjukkan bahwa semua isolat dari daging babi fermentasi, ikan fermentasi, daun teh fermentasi, dan acar bawang, yang termasuk genus *Lactobacillus* mampu hidup pada pH 7. Hampir semua bakteri, termasuk genus *Lactobacillus*, mampu tumbuh pada pH netral (Jay, 2000 dalam Mavhungu, 2005; Battcock & Azam-Ali, 1998).

Bakteri yang termasuk dalam genus *Lactobacillus*, umumnya memiliki kemampuan bertahan hidup pada lingkungan asam. Hal serupa juga diungkapkan Yoon *et al.* (2005) yang melakukan penelitian tentang kemampuan bakteri asam laktat bertahan hidup di lingkungan asam. Hasil penelitian Yoon *et al.* (2005) menunjukkan *L. casei*, *L. plantarum*, dan *L. delbrueckii* mampu bertahan pada lingkungan dengan kisaran pH 3,4 – 3,6 selama 72 jam. Penelitian yang dilakukan oleh Mahrous *et al.* (2006) juga menunjukkan bahwa *L. fermentum* dan *L. salivarius* yang mampu bertahan hidup pada pH 4 hingga pH 2.

Hasil pengujian menunjukkan 25 isolat yang diperoleh mampu bertahan hidup di pH 3 (Tabel 3). Kondisi ini diduga disebabkan pH pengujian tidak berbeda jauh dengan pH habitat dari isolat, yaitu sayur asin yang memiliki kisaran pH 3. Menurut Klayraung *et al.* (2008), ekosistem asal isolat berperan penting dalam menentukan kemampuan bakteri beradaptasi di lingkungan asam (*stress condition*).

5.2.2. Kemampuan Bertahan Hidup terhadap Garam Empedu

Kemampuan isolat membentuk koloni setelah diinkubasi pada media yang memiliki kandungan garam empedu selama waktu tertentu menunjukkan isolat tersebut mampu bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung garam empedu (Gambar 9). Diketahui bahwa 25 isolat genus *Lactobacillus* mampu bertahan hidup pada konsentrasi garam empedu 0,3%, 0,5%, dan 1% pada jam ke-2 sampai jam ke-4 (Tabel 4).

Penelitian yang dilakukan oleh Mahrous *et al.* (2006) menunjukkan *L. fermentum* dan *L. salivarius* mampu bertahan hidup pada lingkungan dengan konsentrasi garam empedu 0,2% - 0,4%. Menurut Mahrous *et al.* (2006), lingkungan yang mengandung garam empedu berpengaruh terhadap kelangsungan hidup bakteri probiotik. Semakin tinggi konsentrasi garam empedu maka semakin rendah kemampuan hidup bakteri asam laktat. Garam empedu merusak membran sel bakteri, di mana komponen utama membran sel adalah *lipid* dan asam lemak. Kondisi ini mempengaruhi permeabilitas membran sel (Klayraung *et al.* 2008). Hasil penelitian yang dilakukan Klayraung *et al.* (2008) menunjukkan bahwa genus *Lactobacillus* yang diisolasi dari daging babi fermentasi, ikan fermentasi, daun teh fermentasi, dan acar bawang mampu bertahan hidup pada lingkungan dengan konsentrasi garam empedu 0,3% - 1%.

5.2.3. Aktivitas Antibakteri

Bakteri yang digunakan dalam pengujian aktivitas antimikrobia bakteri asam laktat adalah *S. aureus* (ATCC 25923) dan *E. coli* (ATCC 25922). Kedua bakteri patogen ini merupakan bakteri penyebab penyakit diare, yang mayoritas penularannya berasal dari makanan (*food borne disease*). Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 10) dapat dilihat bahwa ke-25 isolat bakteri asam laktat memiliki daya hambat yang cukup kuat terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Isolat 67, 68, dan 71 (Gambar 11a) memiliki daya hambat yang kuat terhadap *E. coli* yaitu 12,33 mm. Isolat 51, 54, dan 56 (Gambar 11b) diketahui memiliki daya hambat yang kuat terhadap *S. aureus* yaitu 16,67 mm, 16,33 mm, dan 17 mm. Secara keseluruhan, isolat 67, 68, dan 71 memiliki daya hambat terbaik terhadap kedua patogen yang digunakan dalam pengujian. Aktivitas antimikrobia yang ditunjukkan oleh bakteri asam laktat disebabkan kemampuan bakteri asam laktat memproduksi asam yang menghambat bakteri patogen,

maupun adanya substansi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Josephsen & Jespersen dalam Hui *et al.*, 2004).

Berdasarkan pada penelitian Tadesse *et al.* (2005) diketahui bahwa isolat genus *Lactobacillus* memiliki zona hambat $17,3\pm 0,46$ mm terhadap *Salmonella spp.*, $17,4\pm 0,4$ mm terhadap *Shigella flexneri*, $17,08\pm 0,4$ mm terhadap *S. aureus*, dan $15,76\pm 0,47$ mm terhadap *E. coli* O157:H7. Aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *S. aureus* juga ditunjukkan oleh isolat *L. plantarum* dari jagung fermentasi dan sorgum fermentasi (Aramide *et al.*, 2006).

5.3. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dengan API 50 CHL

Isolat 67, 68, dan 71 diketahui mampu bertahan hidup pada pH rendah (pH 3) selama 3 jam dan pada lingkungan yang mengandung garam empedu (0,3%) selama 4 jam yang sesuai dengan kondisi di dalam saluran pencernaan manusia. Selain itu, juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap *Eschericia coli* (ATCC 25922) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Isolat 67, 68, dan 7 diidentifikasi menggunakan alat API 50 CHL yang mempunyai kemampuan identifikasi masing- masing isolat memfermentasi berbagai sumber gula (Yavuzdurmaz, 2007).

Isolat yang mampu memfermentasi sumber gula dan menghasilkan asam akan mengubah warna larutan dari ungu menjadi kuning (Gambar 12-14) dan menunjukkan hasil pengujian positif (Tabel 5). Isolat 67 dan 71 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* 1 dengan tingkat signifikansi 99,9%, sedang isolat 68 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus pentosus* dengan tingkat signifikansi 99,9%.

Penelitian bakteri asam laktat yang diperoleh dari proses fermentasi sayuran seperti yang dilakukan oleh Josephsen & Jespersen dalam Hui *et al.* (2004); Yoon *et al.* (2004), Puspito & Fleet (1985), menunjukkan *L. plantarum* dijumpai pada makanan fermentasi berbasis sayuran baik sebagai *starter* buatan (ditambahkan untuk memicu proses fermentasi) maupun secara alami ada di bahan baku. Lebih lanjut menurut Karovičová & Kohajdová (2005) dan Josephsen & Jespersen dalam Hui (2004), *L. pentosus* merupakan mikroorganisme yang umum dijumpai pada sayuran, seperti zaitun, kubis, dan seledri.

Kemampuan dalam memfermentasi gliserol, D-melesitose, dan D-xilose dapat membedakan *L. plantarum* dan *L. pentosus*. Pada Tabel 5, gliserol, D-xilose, dan D-melesitose ditunjukkan oleh *tube* 1, 6, dan 34. Menurut Zaroni *et al.* (1987), *L. pentosus* dapat memfermentasi gliserol dan D-xilose, namun tidak dapat memfermentasi D-melesitose, sedangkan *L. plantarum* dapat memfermentasi D-melesitose, namun tidak dapat memfermentasi gliserol dan D-xilose.



VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- Sejumlah 25 isolat yang diperoleh dari air rendaman sayur asin termasuk dalam genus *Lactobacillus*.
- Semua isolat genus *Lactobacillus* yang diperoleh memiliki karakteristik probiotik, yaitu mampu bertahan hidup pada lingkungan dengan pH rendah, mampu bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung garam empedu, dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap patogen *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) dan *Eschericia coli* (ATCC 25922).
- Isolat yang memiliki karakteristik probiotik terbaik dan berpotensi digunakan sebagai *starter* minuman probiotik adalah *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus pentosus*.

6.2. Saran

Penelitian lanjutan diperlukan untuk mendukung penelitian ini, seperti :

- Formulasi minuman probiotik dari isolat yang diperoleh dari air rendaman sayur asin.
- Kemampuan bakteri asam laktat bertahan hidup selama penyimpanan minuman probiotik.

VII. PENGHARGAAN

1. Mengucapkan terima kasih kepada Program Magister Teknologi Pangan, Universitas Katolik Soegijapranata yang telah memberikan subsidi untuk melaksanakan penelitian.
2. Mengucapkan terima kasih kepada Margaretha Evelyne yang telah memberikan ijin menggunakan data penelitian yang berguna untuk mendukung penelitian yang dilaksanakan dan penyusunan laporan penelitian.

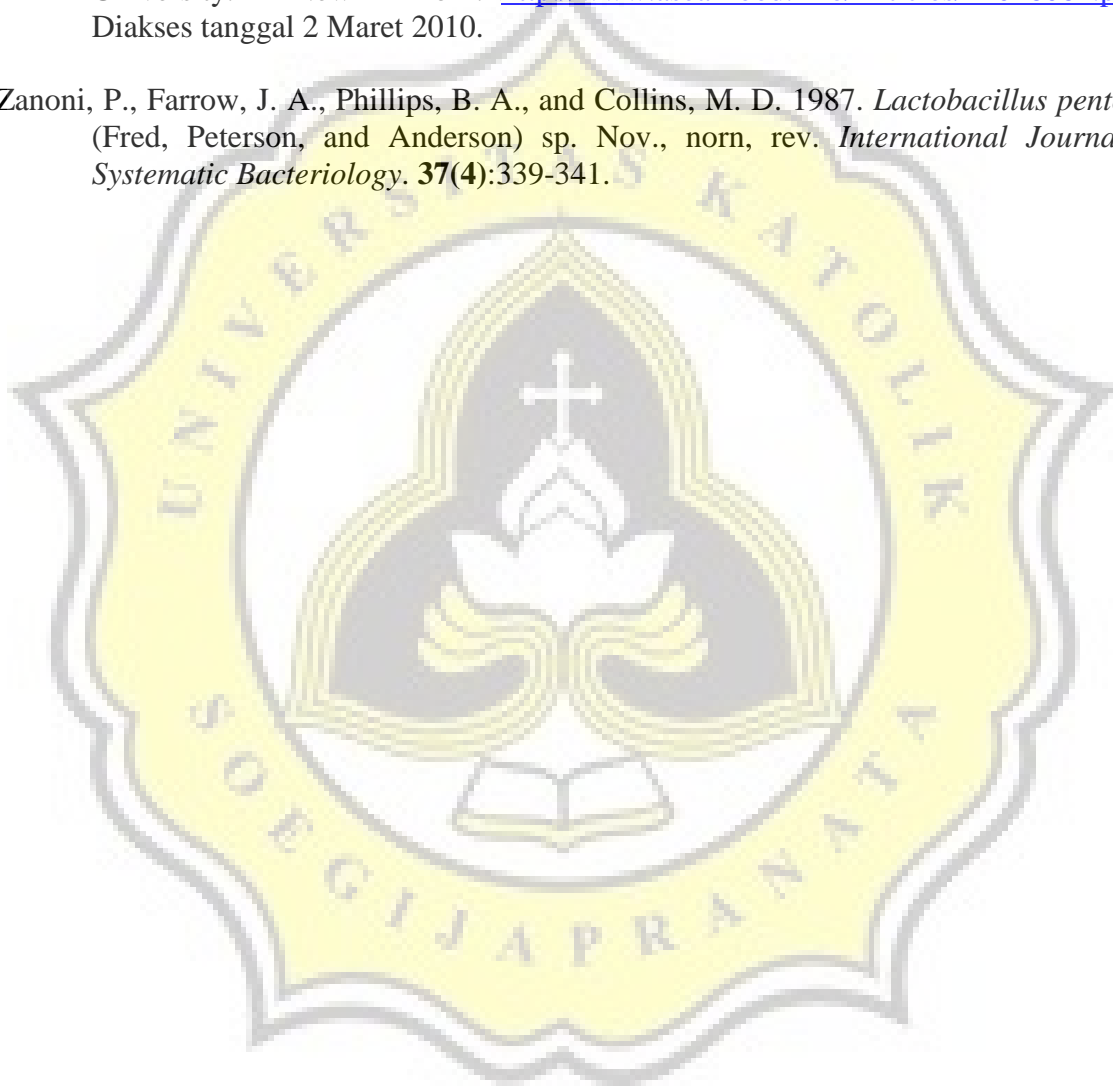
VIII. DAFTAR PUSTAKA

- Al-Allaf, M. A. H., Al-Rawi, A. M. M., and Al-Mola, A. T. (2009). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. Vol 23. Supplement I: 115-117. <<http://www.vetmedmosul.org/ijvs/media/conf-1-18e.pdf>>. Diakses 5 Januari 2010.
- Aramide, A. A., Abiose, S. H., and Adeniran, A. H. (2006). Microbial Evaluation of Probiotic Beverage From Roselle Extract. *African Journal of Food Science*. Vol 1 (12). p 385-392. <<http://www.academicjournals.org/ajfs/PDF/Pdf2009/Dec/Aramide%20et%20al%20Pdf.pdf>>. Diakses tanggal 3 Maret 2010.
- Asraff, M., Arshad, M., Siddique, M., and Muhammad, G. (2009). *In Vitro* Screening of Locally Isolated Lactobacillus Species for Probiotic Properties. *Pakistan Vet. J.*, 29(4): 2009. p 186-190. <http://pvj.com.pk/pdf-files/29_4/186-190.pdf>. Diakses tanggal 19 Mei 2010.
- Astuti, S. M. (2006). Teknik Pelaksanaan Percobaan Pengaruh Konsentrasi Garam dan *Blanching* Terhadap Mutu Acar Buncis. *Buletin Teknik Pertanian* Vol. 11 No. 2: 59-63. <<http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/bt112065.pdf>>. Diakses tanggal 7 Januari 2010.
- Battcock, M., and Azam-Ali, S. (1998). Fermented Fruits and Vegetables A Global Perspective. FAO Agricultural Services Bulletin No. 134. <<http://www.fao.org/docrep/x0560E/x0560e11.htm>>. Diakses 5 Januari 2010.
- Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry 4th Revised and Extended Edition*. Springer. <http://books.google.co.id/books?id=xteiARU46SQC&pg=PA521&lpg=PA521&q=homofermentation,+heterofermentation+pathway&source=bl&ots=HyKv8LQOsB&sig=O0onf7dBAHZzVV2wcSdxIdg5PDI&hl=id&ei=V3mUS8v9L9CHkAXrm6n_DA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CBIQ6AEwAg#v=onepage&q=homofermentation%2C%20heterofermentation%20pathway&f=false>. Diakses tanggal 8 Maret 2010.
- Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams&Wilkins. Baltimore.
- Dimov, S., Ivanova, P., Harizanova, N. (2005). Genetics of Bacteriocins Biosynthesis By Lactic Acid Bacteria. <http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=0&issue_id=9&article_id=236>. Diakses tanggal 2 Januari 2010.
- Duke, J., A. (1983). Brassica juncea (L) Czern – Brassicaceae. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Brassica_juncea.html>. Diakses tanggal 5 Januari 2010.

- Esti and Sediadi, A. (2000). Sayur Asin. <http://www.warintek.ristek.go.id/pangan/buah%20dan%20sayur-sayuran/sayur_asin.pdf>. Diakses tanggal 22 Desember 2009.
- Fuller, R. (1997). *Probiotic2: Applications and Practical Aspects*. Chapman & Hall. Great Britain <<http://books.google.co.id/books?id=qxT9jldK23YC&pg=PA34&dq=fuller,+a+review:+probiotic+in+man+%26+animals&cd=1#v=onepage&q=fuller%2C%20a%20review%3A%20probiotic%20in%20man%20%26%20animals&f=false>>. Diakses tanggal 5 Maret 2010.
- Helmi, R., L. (2008). Potensi Pemanfaatan Limbah Air Kelapa untuk Pembuatan Inokulum Cair Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*). <http://www.wnpg.org/frm_index.php?pg=informasi/info_makalah.php&act=edit&id=43>. Diakses tanggal 7 Januari 2010.
- Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Hansen, Å. S., Josephsen, J., Stanfield, P. S., and Toldrá, F. (2004). *Handbook of food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, Inc. United States of America.
- Johnson, G., I; Weinberger, K; Wu, M. 2008. The Vegetable Industry in Tropical Asia: Indonesia. <http://www.avrdc.org/publications/socio/veg_industry/Indonesia.pdf>. Diakses tanggal 5 Oktober 2009.
- Karovičová, J., & Kohajdová, Z. 2005. Lactic Acid Fermented Vegetable Juices – Palatable and Wholesome Foods. *Chemical pap.* **59(2)**:143-148.
- Kim, S., and Nicastro, L. C. (2008). Juice Beverage With Probiotic Bacteria. <<http://www.faqs.org/patents/app/20080299255>>. Diakses tanggal 3 Maret 2010.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., and Okonogi, S. 2008. Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Thai Traditional Food. *Science Pharm.* **76**:485-503.
- Koebnick, C., Wagner, I., Leitzmann, P., Stern, U., and Aunft, F. (2003). Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol.* Vol 17, No. X. P 1-5. <http://www.rima.org/web/medline_pdf/Can%20J%20Gastroenterol_655.pdf>. Diakses tanggal 2 Maret 2010.
- Kozačinski, L., Zdolec, N., Reichardt J. G., Alagić, D., Vesković-Moračanin, S., and Hadžiosmanović, M. 2006). Influence of bacteriocins on Characteristics and safety of Traditionally fermented sausages. *Znanstveno Stručni Dio.* **7(4)**:219-223.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganism 10th ed.* Pearson Education, Inc. New Jersey. xxv + 1019 p.

- Mahrous, H., M. A., El Soda, K.A., Ell-Halfawy, and K. M., Kamaly. 2006. Effect of Bile Salt and Acidity on the Viability of Some Lactic Acid Bacteria. *Journal Rd. Science and Technology*. **3(2)**:13-20.
- Mavhungu, J. 2005. *Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from "Ting" in the Northern Province of South Africa*. Thesis, University of Pretoria.
- Mezaini, A., Chihib, N., Bouras, A. D., Nedjar-Arroume, N., and Hornez, J., P. (2009). Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *Journal of Environment and Public Health*. Vol 2009.
<<http://www.hindawi.com/journals/jeph/2009/678495.htm>>. Diakses tanggal 2 Januari 2010.
- Puspito, H., and Fleet, G., F. (1985). Microbiology of sayur asin fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22: 442-445.
- Ray, B., & Bhunia, A. 2008. *Fundamental Food Microbiology*. 4th Edition. CRC Press. United States of America. xlii+492p.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84 (2000):197-215.
<<http://journals.pasteur.ac.ir/jbiot2000/843/843197.pdf>>. Diakses tanggal 11 Mei 2010.
- Sabinsa Corporation. (2008). LactoSpore – Bacillus coagulans.
<<http://www.lactospore.com/back.htm>>. Diakses tanggal 2 Januari 2010.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, H. N., and Traore, A., S. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3) : 174-179.
<<http://www.pjbs.org/pjnonline/fin202.pdf>>. Diakses tanggal 19 November 2009.
- Tadasse, G., Ephraim, E., and Ashenafi, M. (2005). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food-borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Internet Journal of Food Safety* V: 13-20.
<<http://www.internetjfs.org/articles.ijfsv5-3pdf>>. Diakses tanggal 19 November 2010.
- Walpole, R. E., and Myers, R. H. (1985). *Probability and Statistics for Engineers and Scientists 3rd ed.* Macmillan Publishing Company. New York. xiii + 639p.
- World of Microbiology and Immunology. (2003). Lactic Acid Bacteria.
<<http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3409800338.html>>. Diakses tanggal 26 Desember 2009.

- Yavuzdurmaz, H. (2007). Isolation, Characterization, Determination Of Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria From Human Milk. Thesis. Izmir Institute of Technology. <<http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/gidamuh/T000712.pdf>>. Diakses tanggal 19 Mei 2010.
- Yoon, Y. K., Woodams, E. E., and Hang, Y. D. (2005). *Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria*. Department of Food Science and Technology Cornell University. New York.<<http://www.aseanfood.info/Articles/11016064.pdf>>. Diakses tanggal 2 Maret 2010.
- Zanoni, P., Farrow, J. A., Phillips, B. A., and Collins, M. D. 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. Nov., norn, rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37(4)**:339-341.



LAMPIRAN 1. Medium

1.1. Medium MRS Merck (agar dan broth)

Medium MRS agar dibuat dengan mengencerkan 57 gram bubuk *Merck* MRS Agar dalam 1 liter akuades, kemudian diaduk menggunakan *stirer* sambil dipanaskan selama 1 menit sampai bubuk terlarut merata. Setelah itu medium MRS disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit. Komposisi MRS agar (per liter) adalah : 10 gram kasein / daging pepton, 5 gram ekstrak *yeast*, 20 gram dekstrosa, 1 ml polioksietilen sorbitan monooleat (tween 80), 2 gram amonium sitrat ((NH₄)₂HC₆H₅O₇), 5 gram sodium asetat (NaC₂H₃O₂.3H₂O), 0,1 gram magnesium sulfat (MgSO₄.7H₂O), 0,05 gram mangan sulfat (MnSO₄.4H₂O), 2 gram dipotasium fosfat (K₂HPO₄), dan 12 gram agar.

Medium MRS *broth* dibuat dengan mengencerkan 45 gram bubuk *Merck* MRS *broth* dalam 1 liter akuades, kemudian diaduk menggunakan *stirer* sambil dipanaskan selama 1 menit sampai bubuk terlarut merata. Setelah itu medium PDA disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit. Komposisi MRS *broth* (per liter) sama seperti komposisi MRS agar tanpa kandungan agar.

1.2. Medium Mueller-Hinton Merck

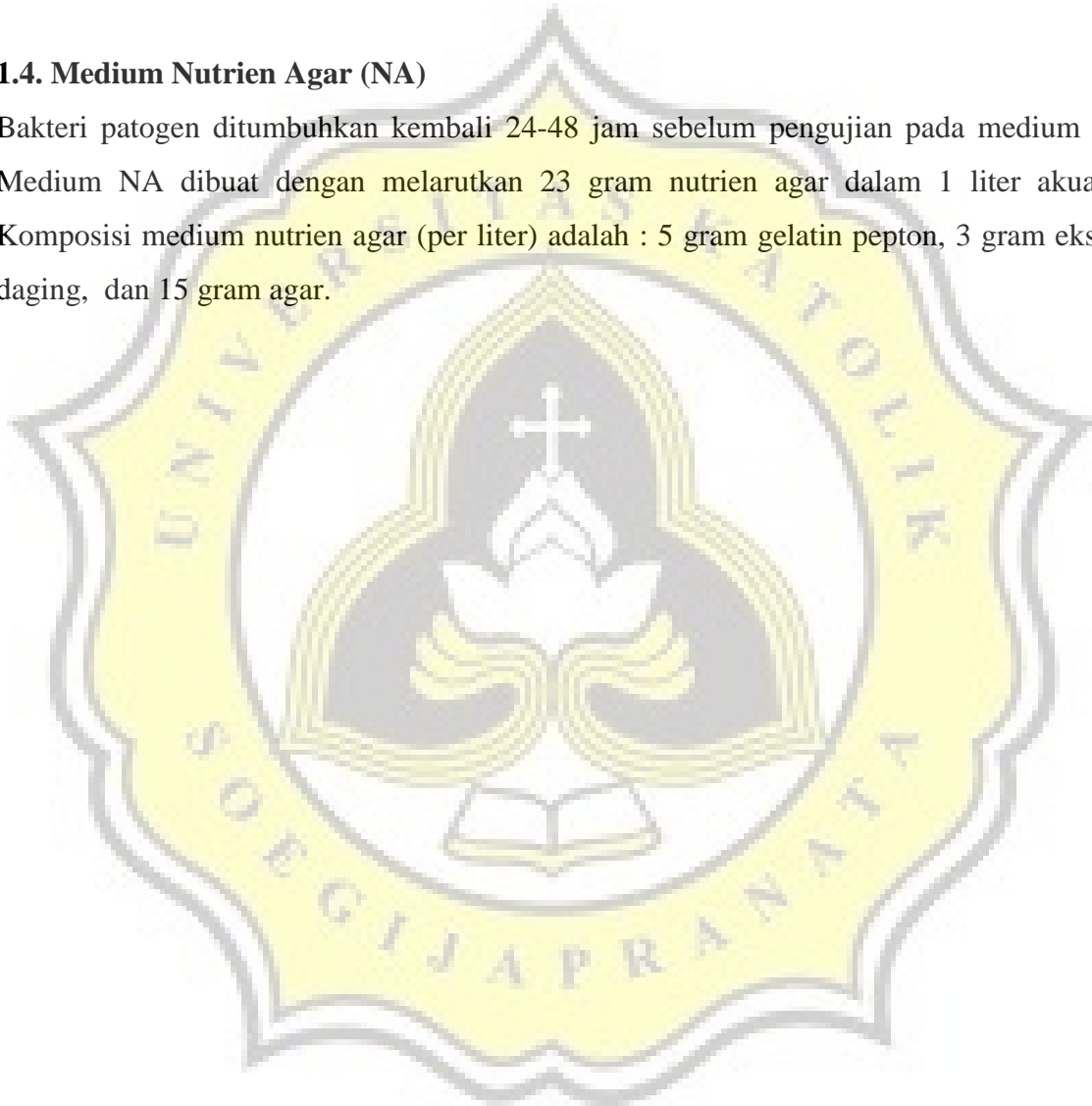
Medium Mueller-Hinton agar dibuat dengan mengencerkan 41 gram bubuk *Merck* Mueller-Hinton agar dalam 1 liter akuades, kemudian diaduk menggunakan *stirer* sambil dipanaskan selama 1 menit sampai bubuk terlarut merata. Setelah itu medium Mueller-Hinton disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit. Komposisi Mueller-Hinton agar (per liter) adalah : 5 gram bubuk ekstrak daging (*beef*), 17,5 gram *acid digest of casein*, 1,5 gram pati, dan 17 gram agar.

1.3. Medium Broth Kaldu Laktosa Merck

Bubuk kaldu laktosa *Merck* sebanyak 13 gram dilarutkan dalam 1 liter akuades kemudian diaduk menggunakan *stirer* selama 1 menit sampai bubuk terlarut merata.. Tuang medium *broth* kaldu laktosa dalam tabung reaksi yang sudah diisi tabung durham (10 ml medium untuk 1 ml inokulum). Setelah itu medium kaldu laktosa disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit. Komposisi medium kaldu laktosa *broth* (per liter) adalah : 3 gram bubuk ekstrak daging (*beef*), 5 gram pepton, dan 5 gram laktosa.

1.4. Medium Nutrien Agar (NA)

Bakteri patogen ditumbuhkan kembali 24-48 jam sebelum pengujian pada medium NA. Medium NA dibuat dengan melarutkan 23 gram nutrien agar dalam 1 liter akuades. Komposisi medium nutrien agar (per liter) adalah : 5 gram gelatin pepton, 3 gram ekstrak daging, dan 15 gram agar.



LAMPIRAN 2. Reagensia

2.1. Indikator Fenol Merah

Sebanyak 0,1 gram fenol merah dilarutkan dalam 2,8 ml larutan NaOH 0,1M (4 gram NaOH murni *Merck* dilarutkan dalam 1 liter akuades). Setelah tercampur merata, larutan diencerkan dengan akuades hingga volume 100 ml.

2.2. Larutan Ungu Kristal

- Larutan A
Sebanyak 2 gram kristal violet (kandungan zat warna 85%) dilarutkan dalam 20 ml etanol 95 %.
- Larutan B
Sebanyak 0,8 gram amonium oksalat dilarutkan dalam 80 ml akuades.

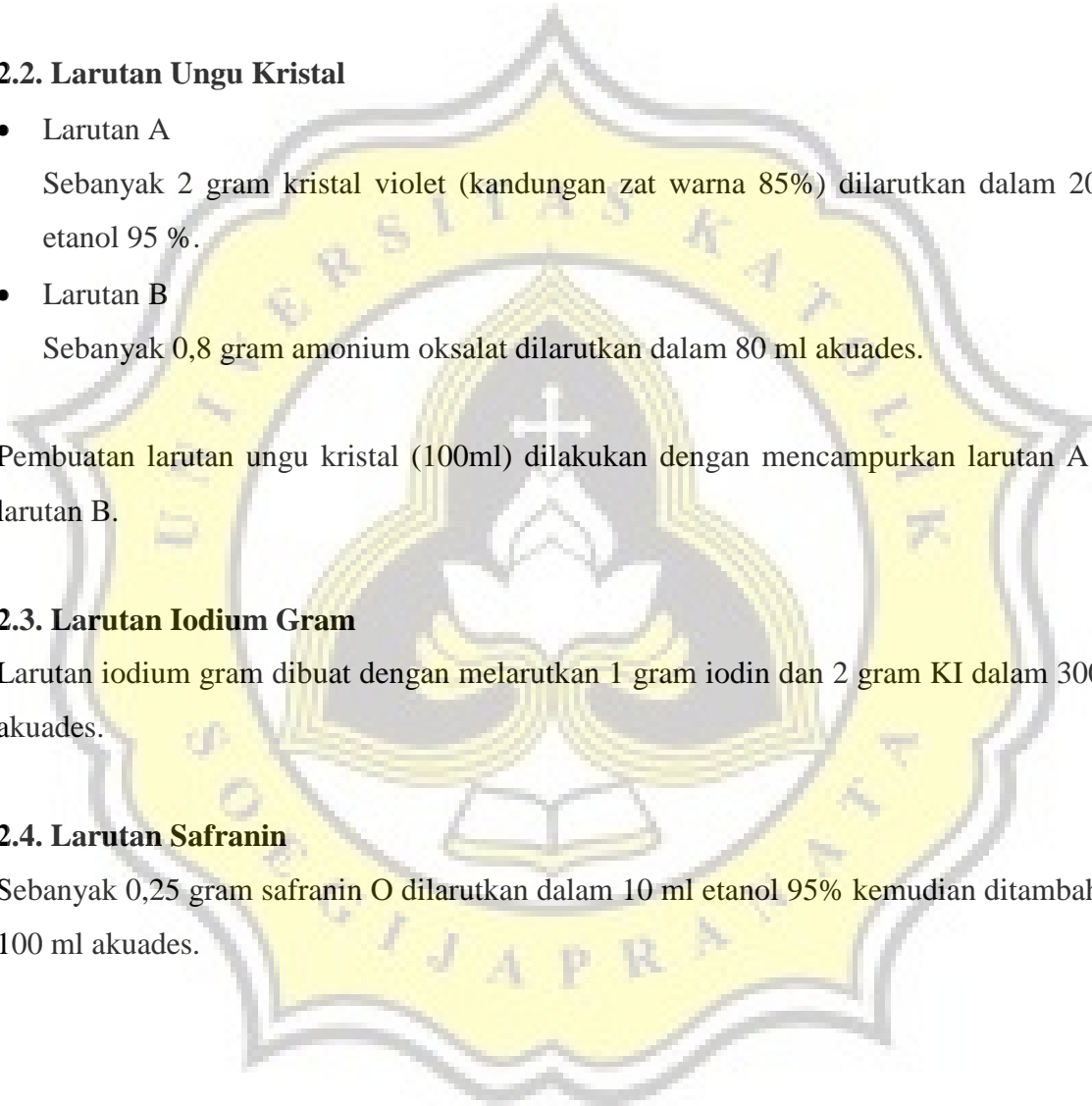
Pembuatan larutan ungu kristal (100ml) dilakukan dengan mencampurkan larutan A dan larutan B.

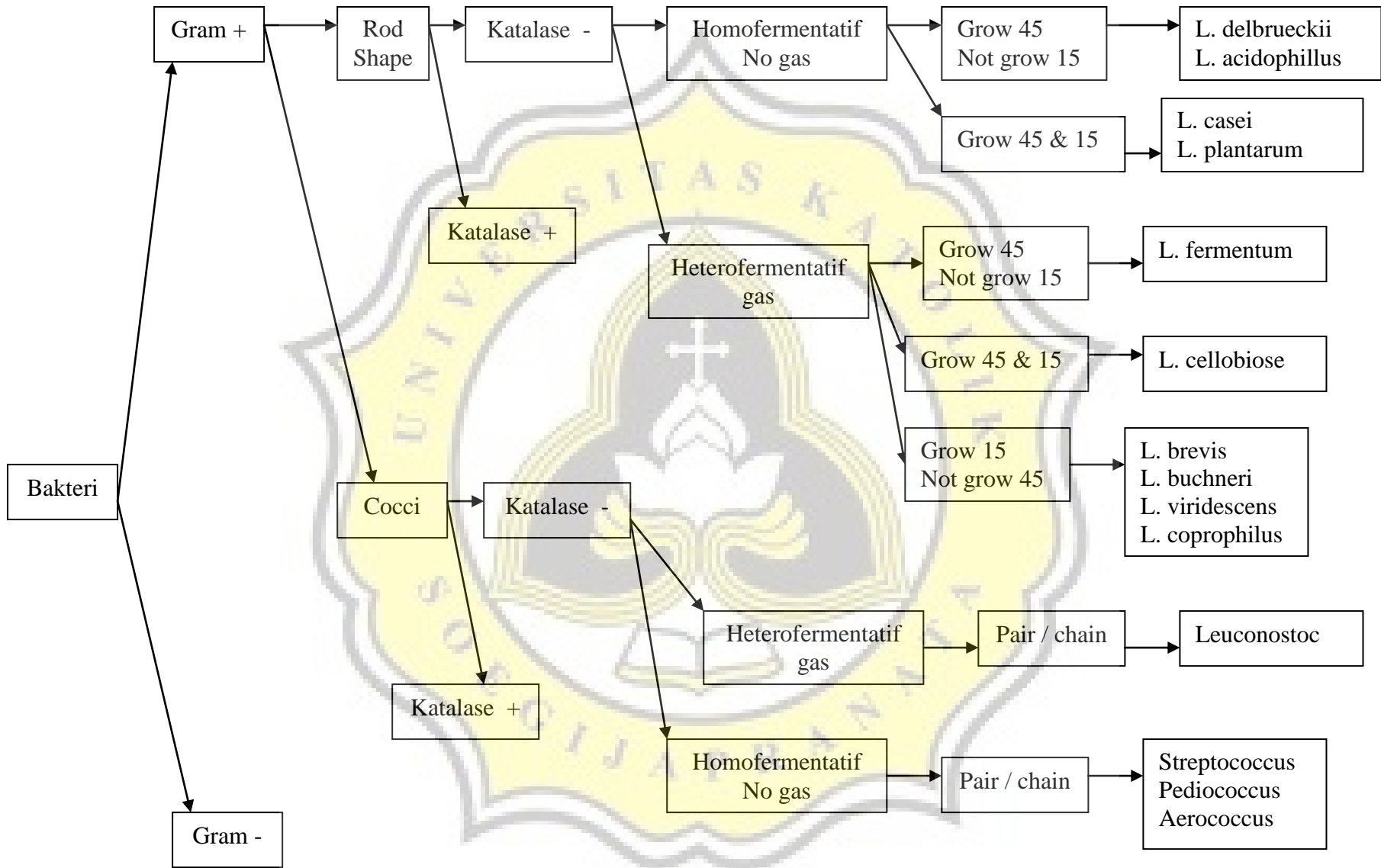
2.3. Larutan Iodium Gram

Larutan iodium gram dibuat dengan melarutkan 1 gram iodin dan 2 gram KI dalam 300 ml akuades.

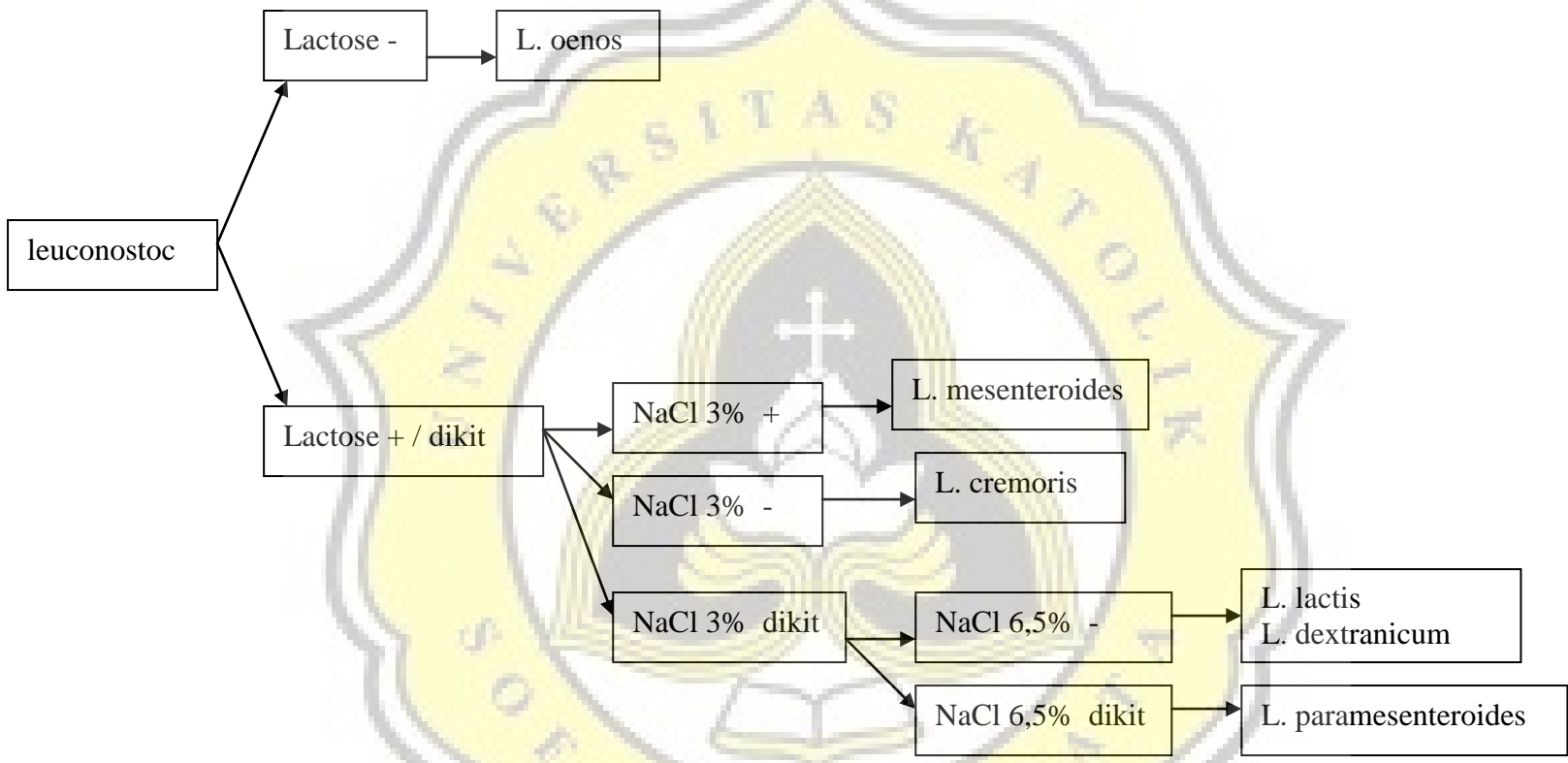
2.4. Larutan Safranin

Sebanyak 0,25 gram safranin O dilarutkan dalam 10 ml etanol 95% kemudian ditambahkan 100 ml akuades.

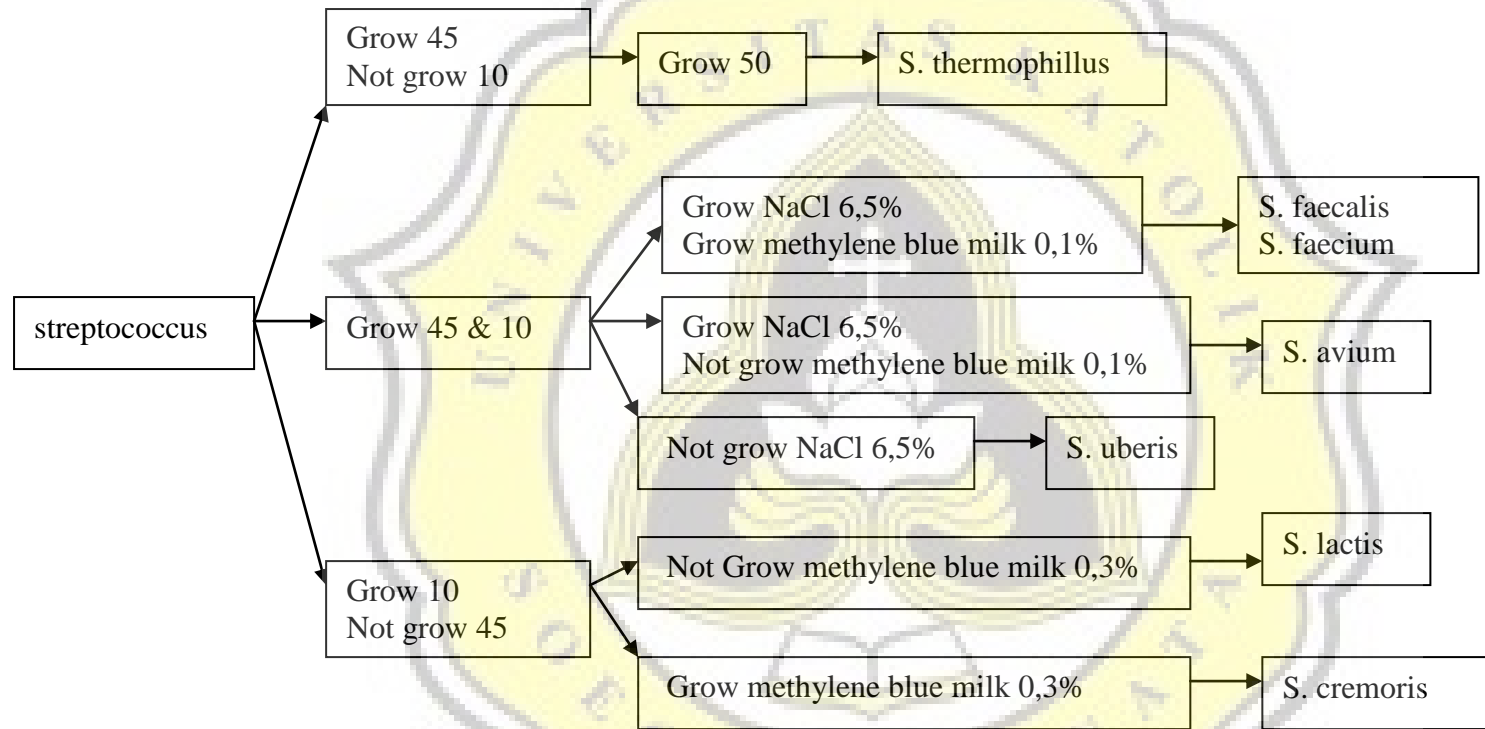




LEUCONOSTOC



STREPTOCOCCUS



PEDIOCOCCUS & AEROCOCCUS

