

4. PEMBAHASAN

Kubis merupakan bahan pangan jenis sayur yang mudah ditemukan namun mudah rusak jika penanganan yang diberikan kurang tepat. Oleh sebab itu, proses pengawetan kubis diperlukan untuk mengurangi limbah serta meningkatkan nilai konsumsi dari kubis. Salah satu cara pengawetan yang dapat dilakukan adalah dengan fermentasi. Menurut Das *et al.* (2016) fermentasi merupakan proses metabolisme yang mengkonversi gula menjadi asam, gas, atau alkohol oleh mikroorganisme. Proses tersebut berjalan secara spontan yaitu tidak dilakukan penambahan starter melainkan mikroorganisme akan tumbuh dengan sendirinya karena lingkungan dan substrat yang sesuai (Desniar *et al.*, 2009). Kubis sendiri merupakan salah satu sumber bakteri asam laktat seperti teori dari (Fardiaz, 1992) bahwa bakteri asam laktat dapat bersumber dari permukaan sayuran seperti kubis.

Proses fermentasi kubis putih menggunakan larutan garam, dimana garam berfungsi untuk mengubah tekanan osmotik (Das *et al.*, 2016). Desniar *et al.* (2009) menjelaskan bahwa jumlah garam yang ditambahkan pada proses fermentasi akan menentukan jenis mikroorganisme yang tumbuh. Kadar garam yang umumnya digunakan untuk proses fermentasi kubis putih adalah 2%-5% (Amor *et al.*, 2007 dalam Utama *et al.*, 2013). Penelitian dari Thakur & Kabir (2015) menunjukkan hal yang sama yaitu kadar garam yang digunakan untuk pembuatan acar kubis putih adalah 2,5%. Pada penelitian kali ini, kadar garam yang digunakan untuk memfermentasikan kubis putih adalah 5% dan 7,5%. Penggunaan kadar garam tersebut sesuai dengan pernyataan Swain *et al.* (2014) yang mengatakan bahwa konsentrasi garam yang dapat digunakan untuk proses fermentasi sayur berkisar antara 2-10%.

Penambahan kadar garam mencapai 7,5% dilakukan dengan tujuan menghindari kontaminasi karena menurut Desniar *et al.* (2009) penambahan garam dengan konsentrasi tinggi pada proses fermentasi spontan dapat menghambat mikroorganisme yang tidak diinginkan. Namun, hasil fermentasi acar kubis putih Gedongsongo, Bandungan menunjukkan pada penggunaan kadar garam 7,5% mengalami kontaminasi. Hasil tersebut dijelaskan dengan pernyataan Das *et al.* (2016) bahwa penggunaan konsentrasi garam yang tinggi (7,5%) akan menghambat tumbuhnya bakteri

heterofermentatif dan mendorong tumbuhnya bakteri homofermentatif yang akan memerangkap karbondioksida sehingga akan memicu pertumbuhan *yeast*.

Selain itu hasil penelitian sebelumnya dari Thakur & Kabir (2015) menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar garam maka jumlah asam laktat yang dihasilkan semakin rendah. Hal tersebut sesuai dengan penelitian pendahuluan bahwa pH pada perlakuan kadar garam 5% lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan kadar garam 7,5%. Oleh sebab itu, dalam proses fermentasi kubis, kadar garam memiliki peranan yang sangat penting. Penggunaan kadar garam yang terlalu tinggi dapat menghambat proses fermentasi, sedangkan jika kadar garam yang digunakan terlalu rendah maka akan mendorong tumbuhnya bakteri proteolitik yang akan menyebabkan aroma yang tidak diharapkan serta tekstur menjadi lebih lunak (Hutkins, 2006).

4.1. Isolasi Bakteri Asam

Isolasi bakteri asam laktat dilakukan untuk mengambil bakteri asam laktat yang tumbuh pada fermentasi kubis. Proses isolasi dilakukan menggunakan media MRSA yang ditambah dengan CaCO_3 1%. Penggunaan media MRSA sesuai dengan pernyataan Rinto *et al.* (2012), bahwa MRSA merupakan medium selektif yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat. Penambahan CaCO_3 tersebut sesuai dengan pernyataan Astuti (2016) yang mengatakan bahwa penggunaan CaCO_3 adalah sebagai indikator dari terbentuknya zona hambat di sekitar isolat bakteri asam laktat. Sehingga dengan menggunakan indikator tersebut, dapat dibedakan antara isolat bakteri asam laktat maupun bukan bakteri asam laktat. Zona hambat tersebut muncul akibat sifat basa dari CaCO_3 yang bereaksi dengan asam yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat (Yusmarini *et al.*, 2010). Perbedaan pengenceran dilakukan dengan tujuan untuk memungkinkan mendapat isolat yang berbeda serta mempermudah untuk proses isolasi pada isolat tunggal hasil *Total Plate Count* (TPC).

4.2. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Setelah dilakukan proses isolasi, isolat yang berhasil didapatkan kemudian diuji untuk proses identifikasi bakteri asam laktat. Pengujian yang dilakukan antara lain adalah uji

katalase, produksi gas, motilitas, perwarnaan gram serta pewarnaan spora. Das *et al.* (2016) menyebutkan bahwa ciri dari bakteri asam laktat adalah tidak membentuk spora, merupakan Gram positif, serta berbentuk bulat atau batang. Adams & Nout (2001), menambahkan ciri lain dari bakteri asam laktat adalah bersifat anaerob, non motil, katalase negatif, dan menghasilkan asam laktat.

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa sebanyak 6 isolat merupakan katalase positif (Gambar 4b), dimana keenam isolat tersebut berasal dari perlakuan kadar garam 7,5%. Katalase positif ditandai dengan adanya gelembung gas pada isolat yang telah ditetesi H_2O_2 3%. Gelembung gas tersebut muncul akibat proses pemecahan oleh enzim katalase yang dihasilkan oleh bakteri aerob. Enzim katalase akan memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Oksigen tersebut nantinya akan digunakan oleh bakteri aerob untuk menunjang pertumbuhannya (Battcock & Azam-Ali, 1998 dalam Harimurti, 2007). Sehingga, 6 isolat tersebut dapat dikatakan bukan bakteri asam laktat. Hasil lain menunjukkan bahwa sebanyak 94 isolat bersifat katalase negatif yang ditandai dengan tidak adanya gelembung gas ketika ditetesi dengan H_2O_2 3% (Gambar 4a). Hasil tersebut sesuai dengan Kivanc *et al.* (2011) yang menjelaskan bahwa bakteri asam laktat tidak menghasilkan enzim katalase melainkan enzim peroksidase yang akan memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi senyawa organik dan air. Sehingga dari pengujian katalase didapatkan sebanyak 94 isolat yang terdiri dari 50 isolat pada kadar garam 5% dan 44 isolat pada kadar garam 7,5% yang merupakan bakteri asam laktat karena bersifat katalase negatif.

Berdasarkan produk yang dihasilkan, bakteri asam laktat dibagi menjadi dua jenis yaitu heterofermentatif dan homofermentatif yang dapat diketahui dengan uji produksi gas. Hasil dari uji produksi gas menunjukkan bahwa sebanyak 64 isolat meliputi 37 isolat dari kadar garam 5% dan 27 isolat dari kadar garam 7,5% merupakan bakteri heterofermentatif dan 36 yang terdiri dari 13 isolat pada perlakuan kadar garam 5% dan 23 isolat pada kadar garam 7,5% merupakan bakteri homofermentatif. Perbedaan kedua jenis tersebut dapat diketahui dengan ada atau tidaknya gelembung pada tabung Durham. Bakteri heterofermentatif akan menghasilkan gelembung udara pada tabung Durham karena bakteri tersebut menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol dan juga

karbondioksida sehingga akan muncul gelembung gas pada tabung Durham. Sedangkan bakteri asam laktat jenis homofermentatif hanya menghasilkan asam organik saja (Adams & Nout, 2001).

Tahap pengujian selanjutnya adalah uji motilitas. Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa sebanyak 85 isolat yang terdiri dari 39 isolat dari kadar garam 5% dan 46 isolat dari kadar garam 7,5% merupakan mikroorganisme bersifat non-motil yang ditandai dengan tumbuhnya bakteri hanya pada daerah tusukan (tidak menyebar) (Gambar 6b). Hal tersebut dikarenakan bakteri yang tumbuh tidak memiliki flagela sehingga tidak dapat bergerak menyebar (Green *et al.*, 1988). Sedangkan 15 isolat yang lain bersifat motil yang ditandai dengan pertumbuhan yang menyebar dari daerah tusukan (Gambar 6a). Sehingga sejumlah 85 isolat tersebut dapat dikatakan merupakan bakteri asam laktat.

Tahap seleksi terakhir adalah uji pewarnaan. Uji pewarnaan meliputi dua uji yaitu pewarnaan Gram dan perwarnaan spora. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui karakteristik isolat yang didapatkan merupakan bakteri Gram negatif atau positif pada pewarnaan Gram, serta bakteri penghasil spora atau non-spora pada pewarnaan spora. Berdasarkan Gambar 7 dapat dilihat bahwa bakteri Gram positif berwarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah. Warna ungu pada bakteri Gram positif tersebut nampak karena asam ribonukleat yang berada pada sitoplasma mengikat warna ungu dari kristal violet. Pengikatan warna tersebut cukup kuat akibat pori-pori bakteri Gram positif menutup sehingga warna lebih sulit dihilangkan dengan alkohol (Moyes *et al.*, 2009). Berdasarkan uji pewarnaan Gram, didapatkan hasil sebanyak 64 isolat yang terdiri dari 36 isolat pada kadar garam 5% dan 28 isolat pada kadar garam 7,5% merupakan bakteri Gram positif yang menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat. Sedangkan sebanyak 36 isolat yang terdiri dari 14 isolat pada kadar garam 5% dan 22 isolat pada kadar garam 7,5% merupakan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet akibat pembilasan menggunakan alkohol, sehingga bakteri Gram negatif akan mengikat warna merah muda dari safranin.

Ciri lain dari bakteri asam laktat adalah bakteri non-spora atau tidak menghasilkan spora yang ditandai dengan warna merah pada preparat ketika diamati dengan menggunakan mikroskop. Pernyataan tersebut didukung oleh Rahayu (2001) yang menjelaskan bahwa bakteri penghasil spora akan berwarna hijau, sedangkan bakteri yang tidak menghasilkan spora akan berwarna merah. Pengikatan warna hijau tersebut dikarenakan zat warna *malachite green* masuk ke dalam spora bakteri dan tidak hilang saat dilakukan pembilasan (Oktari *et al.*, 2017). Sehingga hasil pewarnaan spora menunjukkan bahwa sebanyak 99 isolat berwarna merah (non-spora) (Gambar 8a) yang menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat, dan sebanyak 1 isolat berwarna hijau yaitu isolat E1C16 (Gambar 8b). Dari hasil tersebut isolat E1C16 dideliminasi dan tidak ikut dalam pengujian selanjutnya.

4.3. Identifikasi Genus BAL Berdasarkan Pertumbuhan pada Berbagai pH, Suhu, dan Kadar NaCl

Setelah dilakukan tahap seleksi bakteri asam laktat, didapatkan sebanyak 47 isolat yang masuk ke tahap uji selanjutnya yaitu identifikasi genus. Tahap identifikasi genus dilakukan dengan beberapa uji yaitu pertumbuhan pada suhu 10°C dan 45°C, pertumbuhan pada pH 4,4 dan 9,6 serta pertumbuhan pada kadar garam 6,5% dan 18%. Pertumbuhan bakteri asam laktat dilihat dengan menggunakan spektrofotometer pada jam ke 24 dan 48. Bakteri asam laktat dengan genus *Lactobacillus* pada umumnya dapat tumbuh pada suhu 10°C dan 45°C, pH 4,4 serta kadar garam 6,5%, namun tidak dapat tumbuh pada pH 9,6 dan kadar garam 18% (Rahayu & Margino, 1997). Hasil dari uji genus menunjukkan bahwa semua isolat tidak dapat tumbuh pada kadar garam 18% (pertumbuhan negatif). Namun sebanyak 43 isolat dapat tumbuh pada pH 9,6. Hal tersebut tidak sesuai dengan teori Rahayu & Margino (1997) yang mengatakan bahwa *Lactobacillus* tidak dapat tumbuh pada pH 9,6. Sehingga sejumlah 43 isolat yang dapat tumbuh pada pH 9,6 diduga sebagai *Lactobacillus* (*Lactobacillus**) dikarenakan menurut Vasiee *et al.* (2014) beberapa bakteri dengan genus *Lactobacillus* dapat tumbuh pada pH 9,6 diantaranya adalah *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus bervis*. Sehingga dari 47 isolat yang diuji didapatkan hasil yaitu sebanyak 4 isolat (E1C1, E1C3, E1C7, dan E3C5) memiliki genus *Lactobacillus* dan 43 isolat lain diduga memiliki genus *Lactobacillus* (*Lactobacillus**).

4.4. Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat

Menurut Halim & Zubaidah (2013) probiotik merupakan mikroorganisme yang dalam jumlah yang cukup dapat meningkatkan kesehatan pencernaan manusia. Syarat suatu mikroorganisme dapat tergolong sebagai bakteri probiotik adalah tahan terhadap pH rendah, tahan terhadap garam empedu serta memiliki aktivitas antimikroba untuk bakteri patogen (Vasiee *et al.*, 2014). Hal tersebut didukung oleh pernyataan dari Susanti *et al.* (2007) bahwa bakteri probiotik merupakan bakteri yang dapat bertahan pada kondisi pencernaan manusia yaitu pada pH rendah serta pada kondisi garam empedu. Sehingga bakteri asam laktat dengan genus *Lactobacillus* yang didapat dari pengujian sebelumnya kemudian diuji potensi probiotik dengan beberapa uji yaitu ketahanan terhadap asam pada pH 3 dan pH 7, ketahanan terhadap garam empedu serta kemampuan antimikroba.

Penggunaan pH 3 pada penelitian ini merupakan standar toleransi asam dari bakteri probiotik (Lee & Salminen, 2009 dalam Usmiyati *et al.*, 2011). Selain itu, waktu yang diperlukan makanan masuk ke lambung dengan kondisi pH yang rendah adalah 3 jam, sehingga bakteri yang dapat bertahan pada kondisi lambung tersebut dapat dikatakan sebagai bakteri probiotik. Pada kondisi yang sangat asam, bakteri akan mengalami kerusakan membran sehingga komponen intraseluler seperti Mg, K, serta lemak akan hilang dari sel, sehingga bakteri tidak akan dapat bertahan dan mati (Kimoto *et al.*, 1999 dalam Maunatin & Khanifa, 2012). Sedangkan pada bakteri yang tahan terhadap asam akan memiliki kemampuan untuk menurunkan pH ekstraseluler sehingga akan lebih tahan terhadap kerusakan membran (kebocoran sel) serta dapat mempertahankan pH internal yang lebih basa dibandingkan dengan pH eksternal (Bender & Marquis, 1987 dalam Maunatin & Khanifa, 2012). Selain itu, Triyana & Nurhidayati (2007) dalam Maunatin & Khalifa (2012) menambahkan bahwa *Lactobacillus* dapat mempertahankan kadar keasaman sitoplasma sel sehingga enzim dan protein yang terdapat dalam sel dapat tetap bekerja secara optimal.

Selain pengujian menggunakan pH 3, ketahanan terhadap asam pada bakteri probiotik menggunakan pH 7 yang menggambarkan kondisi pH pada usus kecil (7-8) dan usus besar (6-6,5) (Lee & Salminen, 2009 dalam Usmiyati *et al.*, 2011). Hasil uji ketahanan

asam menunjukkan bahwa semua isolat dapat bertahan pada kondisi pH 3 dan pH 7 (Gambar 9). Hasil tersebut diketahui dengan melihat adanya kekeruhan pada cawan yang berisi media MRSA. Kekeruhan mengindikasikan bahwa isolat tersebut dapat tumbuh dan bertahan pada kondisi tertentu yang diberikan.

Selain harus tahan terhadap kondisi asam pada pencernaan, bakteri probiotik harus tahan terhadap garam empedu. Garam empedu dapat melarutkan sebagian komponen bakteri seperti fosfolipid, kolesterol dan protein, sehingga akan menyebabkan bakteri tidak tahan dan menjadi lisis (Umniyati *et al.*, 2009). Kadar garam empedu 0,3% yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan Gilliland *et al.* (1984) yang mengatakan bahwa kadar 0,3% adalah konsentrasi kritis untuk menyeleksi ketahanan mikroorganisme terhadap garam empedu. Ketahanan terhadap garam empedu tersebut berkaitan dengan enzim *bile salt hidrolase* yang akan menghidrolisa garam empedu sehingga tidak memiliki efek racun bagi bakteri probiotik. Halim & Zubaidah (2013) menambahkan bahwa dinding sel pada bakteri Gram positif memiliki polisakarida yang dapat membantu mempertahankan diri dari kondisi garam empedu. Hasil pengujian ketahanan terhadap garam empedu menunjukkan bahwa semua isolat yang dapat tahan terhadap kondisi garam empedu 0,3% yang dapat dilihat dari adanya kekeruhan pada cawan yang berisi media MRSA (Gambar 10).

Salah satu syarat sifat probiotik selain harus tahan terhadap kondisi asam dan garam empedu juga harus memiliki sifat antimikroba pada bakteri patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sifat antimikroba pada bakteri asam laktat disebabkan karena senyawa asam organik yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Asam organik akan mengubah permeabilitas sel sehingga mengganggu sistem transpor dari bakteri patogen (Halim & Zubaidah, 2013).

Hasil dari pengujian antimikroba menunjukkan bahwa ukuran zona hambat pada *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 lebih kecil jika dibandingkan dengan zona hambat pada *Escherichia coli* FNCC 0091. Namun, meskipun ukuran zona hambat pada *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 lebih kecil, zona hambat tersebut terlihat lebih jelas dan jernih (Gambar 11), berbeda dengan hasil zona hambat pada *Escherichia coli* FNCC 0091 yang lebih keruh. Perbedaan zona hambat tersebut dikarenakan senyawa

antimikroba yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat bersifat bakteriostatik pada *Eschericia coli* FNCC 0091. Hasil tersebut dijelaskan dalam penelitian sebelumnya (Khaerati & Ihwan, 2011) bahwa zona hambat yang keruh dan tidak dapat mempertahankan kejernihannya selama 24 jam menandakan bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan bersifat bakteriostatik yaitu hanya menghambat pertumbuhan patogen. Sedangkan hasil zona hambat yang lebih jernih pada *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dijelaskan Wattimena (1991) dalam Khaerati & Ihwan (2011) bahwa zona hambat yang masih jernih lebih dari 24 jam waktu inkubasi menunjukkan bahwa senyawa antimikroba bersifat membunuh bakteri patogen (bakteriosidal). Zona hambat yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat pada acar kubis putih Gedongsongo, Bandungan lebih kecil jika dibandingkan dengan isolat probiotik yang diperoleh pada fermentasi sawi asin (Halim & Zubaidah, 2013).

Perbedaan kemampuan hambat pada bakteri *Eschericia coli* FNCC 0047 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0091 juga disebabkan karna perbedaan dinding sel dari kedua bakteri tersebut. Dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Halim & Zubaidah, 2013). Sehingga senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat lebih mudah masuk ke dalam dinding sel bakteri Gram positif. Senyawa antimikroba tersebut akan menyebabkan perubahan permeabilitas pada dinding sel bakteri sehingga, bakteri tersebut akan mati.

McKane & Kandel (1985) dalam Maunatin & Khalifa (2012) menambahkan bahwa dinding sel bakteri Gram positif (*Staphylococcus aures*) hanya memiliki satu lapisan tebal peptidoglikan sedangkan pada bakteri Gram negatif (*Eschericia coli*) memiliki tiga lapisan peptidoglikan. Selain itu, membran pada bakteri Gram negatif mengandung fosfolipid, lipoprotein, serta protein yang berfungsi sebagai pelindung terhadap efek antibiotik dari lingkungan luar (Maunatin & Khalifa, 2012). Sehingga dari hasil pengujian antimikroba dapat diketahui bahwa senyawa antimikrob yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat pada acar kubis putih lebih efektif menghambat *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 jika dibandingkan dengan *Eschericia coli* FNCC 0091. Sehingga, dapat dikatakan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari acar kubis putih Gedongsongo, Bandungan lebih dapat menghambat *Escherichia coli* FNCC 0091

karena diameter zona hambatnya yang besar namun kemampuan daya hambatnya lebih dapat bertahan pada *Staphylococcus aureus* FNCC 0047

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah isolat yang menunjukkan efektivitas antimikroba berupa zona hambat pada kadar garam 5% lebih banyak yaitu 4 isolat. Sedangkan pada kadar garam 7,5% hanya terdapat 1 isolat yang menghasilkan zona hambat yang nampak jernih. Hasil tersebut menurut Thakur & Kabir (2015), penggunaan kadar garam yang lebih tinggi akan menghasilkan *sauerkraut* dengan nilai pH yang tinggi sehingga dapat dikatakan produksi asam organik oleh bakteri asam laktat tidak cukup banyak untuk menghambat bakteri patogen. Das *et al.* (2016) menambahkan bahwa kadar garam yang tinggi akan menghambat pertumbuhan dari *Leuconostoc mesenteroides* yang berperan dalam tahap pertama pada proses fermentasi *sauerkraut*.

