



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI ANGGUR BUAH PALA (*Myristica fragrans* Houtt) SEBAGAI PENGHASIL EKSPOLISAKARIDA

Helen J. Lawalata, Christny F. Rompas, dan Elma Fridayanti Kansile
Program Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado
elmakansil@gmail.com

ABSTRAK. Buah pala banyak digunakan dalam formula obat-obatan dan juga berbagai jenis olahan makanan dan minuman. Daging buah pala ini dapat diolah menjadi sirup, sari buah, selai, dodol pala, dan minuman anggur. Buah pala merupakan salah satu habitat alami bakteri, termasuk bakteri asam laktat (BAL). Penelitian ini telah dilakukan untuk mengetahui jenis BAL yang diisolasi dari anggur buah pala (*myristica fragrans houtt*) yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan eksopolisakarida. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 15 isolat BAL yaitu AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9, AP10, AP11, AP12, AP13, AP14, dan AP15. Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh masing-masing isolat yaitu 400 mg/L, 530 mg/L, 1200 mg/L, 730 mg/L, 60 mg/L, 460 mg/L, 600 mg/L, 1260 mg/L, 200mg/L, 930 mg/L, 1130 mg/L, 200 mg/L, 130 mg/L, 1000 mg/L, 800 mg/L. Selanjutnya 15 isolat tersebut diidentifikasi dengan menggunakan metode *profile matching*. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa 15 isolat BAL tersebut termasuk dalam genus *Lactobacillus* dan merupakan spesies *Lactobacillus bulgaricus*.

Kata Kunci: Anggur Buah Pala, Bakteri Asam Laktat, Eksopolisakarida.

ABSTRACT. Nutmeg fruit is widely used in the medicine formula and also various kinds of processed foods and beverages. Nutmeg meat can be processed into syrup, fruit juice, jam, dodol pala and wine. The fruit is one of the natural habitats of bacteria, including lactic acid bacteria (BAL). Research has been conducted to determine the type of BALEs isolated in nutmeg grapes (*myristica fragrans houtt*) which has the ability to produce exopolysaccharides. Based on the results of the study obtained 15 BAL isolates namely AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9, AP10, AP11, AP12, AP13, AP14, and AP15. The exopolysaccharides produced by the isolates are 400 mg/L, 530 mg/L, 1200 mg/L, 730 mg/L, 60 mg/L, 460 mg/L, 600 mg/L, 200 mg/L, 930 mg/L, 1130 mg/L, 200 mg/L, 130 mg/L, 1000 mg/L, 800 mg/L. The next 15 isolates are identified using the *profile matching* method. The results of the identification show that 15 BAL isolates were included in the genus *Lactobacillus* and are a species of *Lactobacillus bulgaricus*.

Keywords: Nutmeg grapes, Lactic Bacteria, Exopolysaccharides.

PENDALUHUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki keragaman tanaman seperti rempah-rempah, sayur-mayur, tanaman umbi, buah-buahan dan masih banyak jenis lainnya. Salah satu rempah-rempah yang digunakan adalah biji pala. Pala banyak digunakan dalam formula obat-obatan dan juga berbagai jenis olahan makanan dan minuman. Selain itu pala juga dapat berfungsi sebagai anti jamur dan antioksidan (Rismunandar, 1990).

Daging buah pala dapat diolah menjadi sirup, sari buah, selai, dodol pala, dan minuman anggur. Salah satu pemanfaatan dari daging buah pala adalah mengolahnya menjadi minuman anggur dengan melalui proses fermentasi. Minuman anggur adalah minuman hasil fermentasi alkohol khamir terhadap gula-gula glukosa dan fruktosa yang terdapat dalam buah (Nurdjanah, 2007).

Fermentasi mempunyai pengertian aplikasi metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai tinggi, seperti asam-asam organik, protein sel tunggal, antibiotika, dan biopolymer. Bakteri asam laktat (BAL) diantaranya didapatkan dari buah yang telah difermentasi (Fuller, 2008).

Beberapa jenis BAL dapat mensintesis *extracellular polysaccharide* atau eksopolisakarida (EPS), yang merupakan polimer sakarida yang disekresikan oleh mikroba keluar sel. Eksopolisakarida yang dihasilkan mikroorganisme banyak digunakan pada industri, sifat fisika dan kimianya serupa dengan polisakarida dari tanaman (selulosa, pektin dan pati). Selain itu EPS memiliki efek kesehatan karena mempunyai aktivitas imunostimulator, antitumor dan aktivitas makrofag serta limfosit untuk meningkatkan ketahanan tubuh (Handayani, 2009).

Sementara ini penelitian tentang kemampuan BAL menghasilkan eksopolisakarida hanya difokuskan pada produk fermentasi berbasis susu. Sedangkan produksi eksopolisakarida oleh BAL dari produk selain susu diantaranya

adalah dari makanan atau minuman fermentasi sehingga belum banyak diketahui jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan BAL pada fermentasi berbasis buah-buahan. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat dari fermentasi anggur buah pala (*myristica fragrans houtt*) dalam menghasilkan eksopolisakarida ini penting dilakukan.

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Negeri Manado pada bulan April – Juni 2019.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah wadah kedap udara, autoklaf, laminar air flow, sentrifugasi dingin, timbangan analitik, pengering, *blue tip*, cawan petri, *beaker glass*, tabung reaksi, gelas ukur, erlemeyer dan tabung sentrifuge. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah anggur buah pala, alkohol 70 %, etanol 96%, H₂O₂3%, media MRSB (de mann rogose and sharpe broth), media MRSA (de mann rogosa sharpe agar), CaCO₃, NaCl, NaOH, HCl, pewarnaan gram, *malchite green*, kertas label, plastik wrap, aluminium foil, plastik tahan panas, karet gelang, tissue, kapas dan aquades.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel

Daging buah pala diblender terlebih dahulu untuk diambil sari buahnya, kemudian sari buah pala di tambahkan dengan air rebusan touge, ragi dan gula secukupnya, selanjutnya difermentasi selama 7 hari.

Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Sterilisasi dilakukan di autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

Pembuatan media MRSA dan MRSB

Untuk membuat media larutan MRSA, diperlukan aquades sebanyak 250mL, MRSB 13,8, agar 5gr, dan CaCO₃ 2,5gr. Dimasukan kedalam erlenmeyer dan di panaskan diatas hot plate hingga mendidih dan ditutup dengan kapas. Disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

Untuk membuat media larutan MRSB, diperlukan aquades sebanyak 150 mL, MRSB 7,83 gram. Dimasukan kedalam erlenmeyer dan di panaskan diatas hot plate hingga mendidih dan ditutup dengan kapas. Disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

Isolasi bakteri asam laktat

Sebanyak 1mL anggur buah pala disuspensikan ke dalam aquades steril. Dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10⁻⁹. Hasil pengenceran 10⁻⁷, 10⁻⁸ dan 10⁻⁹ ditanamkan dalam media MRSA + CaCO₃ dengan menggunakan metode tuang kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Koloni dimurnikan dengan metode gores pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Isolat murni ditumbuhkan pada media MRSB dan diinkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Isolat murni dibiakan pada media agar miring sebagai stok.

Karakterisasi dan Identifikasi BAL

Isolat yang disimpan sebagai kultur stok ditumbuhkan pada media MRSB dan diinkubasi pada Suhu 37⁰C selama 48 jam. Isolat yang tumbuh pada media MRSB selanjutnya dikaretrisasi berdasarkan sifat fenotipik (karakter morfologi, fisiologi dan biokimia).

Produksi Eksopolisakarida Kasar

15mL inokulum BAL yang ditumbuhkan dalam media MRSA selama 24 jam disentrifugasi 5000 rpm pada 4⁰C selama 30 menit dan didapatkan supernatan sebanyak 10mL. Supernatan

tersebut ditambahkan dengan etanol dingin (95%) disimpan dalam kulkas, kemudian dilakukan sentrifugasi 6000 rpm pada 4⁰C selama 20 menit sehingga didapatkan pellet. Pellet tersebut dikeringkan pada suhu 100⁰, sehingga didapatkan berat konstan

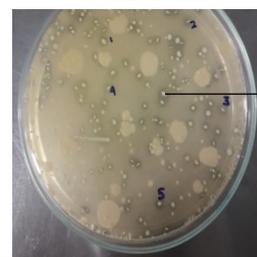
Analisi Data

Data yang diperoleh dari hasil identifikasi disajikan secara deskriptif kualitatif meliputi karakteristik morfologi dan biokimia dari masing-masing isolat bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi dari fermentasi anggur buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) dan nilai eksopolisakarida kasar yang dihasilkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dari fermentasi anggur buah pala (*myristica fragrans* houtt).

Hasil isolasi bakteri dari fermentasi anggur buah pala (*myristica fragrans* houtt) diperoleh 15 isolat yang membentuk zona bening pada media MRS Agar + CaCO₃. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat akan mengikat CaCO₃ menjadi Ca-laktat yang larut, sehingga menimbulkan zona bening. Zona bening tersebut dapat digunakan sebagai penanda terdapatnya koloni bakteri asam laktat. Kenampakan isolat BAL pada media dapat dilihat pada Gambar 1.



Koloni BAL yang ditunjukkan dengan adanya zona bening.

Gambar 1. Koloni BAL yang ditunjukkan dengan penampakan zona bening disekitarnya pada media MRS Agar + CaCO₃.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni dari 15 isolat (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9, AP10, AP11, AP12, AP13, AP14, dan AP15) terdapat 8 isolat yang memiliki warna koloni putih susu sedangkan 7 isolat

berwarna krem, bentuk koloni bulat, tepian rata, permukaan cembung. Selanjutnya 15 isolat tersebut dilakukan *screening* terhadap bakteri asam laktat dengan melakukan uji konfirmasi terhadap isolat yang diduga sebagai BAL dengan melakukan uji pewarnaan gram, uji katalase, uji pewarnaan endospora, dan uji motilitas.

Screening bakteri asam laktat

Berdasarkan *screening* yang dilakukan didapatkan hasil bahwa 15 isolat penghasil asam diduga kuat sebagai Bakteri asam laktat (BAL) berdasarkan kriteria bersifat gram positif, sel berbentuk batang, tidak membentuk spora, katalase negatif, non motil dan memiliki tipe fermentasi yaitu homofermentatif.

Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan gram, tidak membentuk spora, bereaksi negatif terhadap katalase dan non motil. Tipe fermentasi bakteri asam laktat meliputi homofermentatif (hasil fermentasinya 80% asam laktat) dan heterofermentatif (hasil fermentasinya 50% asam laktat dan ada juga asam organik lainnya seperti asetat, gas CO₂ dan etanol) (Widyastuti, dkk, 1998).

Isolat bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 15 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi anggur buah pala (*myristica fragrans houtt*) memiliki karakteristik morfologi, fisiologi dan biokimia yang sama serta memiliki kemampuan dalam menghasilkan eksopolisakarida. Namun, nilai eksopolisakarida yang diperoleh oleh masing-masing isolat bakteri asam laktat (BAL) berbeda-beda.

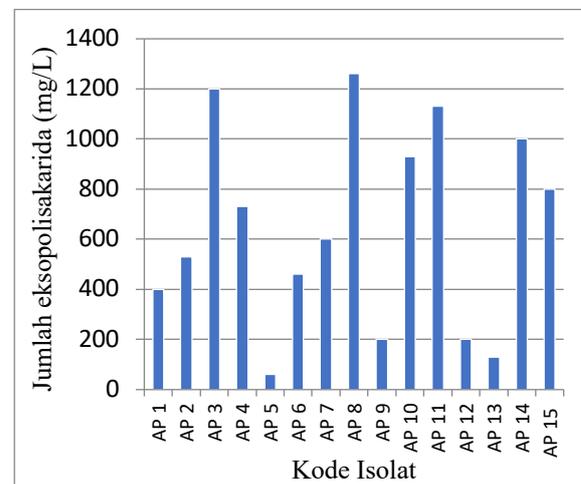
Produksi eksopolisakarida terendah adalah 60mg/L sedangkan produksi eksopolisakarida tertinggi adalah 1260mg/L. Kemampuan memproduksi

EPS suatu isolat pada umumnya dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan. Produksi eksopolisakarida dari 15 isolat tersebut dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Eksopolisakarida yang mengendap didasar tabung

Gambar 2. Hasil uji produksi Eksopolisakarida isolat BAL dari fermentasi anggur buah pala (*Myristica fragrans Houtt*).



Gambar 3. Grafik produksi eksopolisakarida

Karakterisasi dan identifikasi isolat BAL

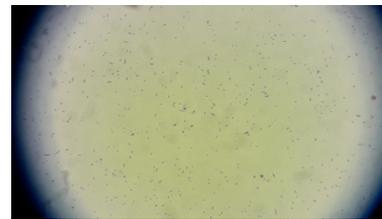
Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa 15 isolat BAL merupakan bakteri gram positif, yaitu sel bakteri berwarna ungu setelah dilakukan pengecatan gram (Gambar 4). Pada peawarnaan endospora, spora yang dihasilkan oleh bakteri akan menyerap *malachite green*, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah dikarenakan pewarnaan safranin. Dari hasil pewarnaan endospora menunjukkan bahwa tidak ditemukan endospora pada sel isolat bakteri dari fermnatsi anggur buah pala, karena yang terlihat hanyalah sel vegetatif yang berwarna merah

dikarenakan pewarnaan safranin. Ke-15 isolat memberikan hasil uji motilitas yaitu non motil, yang berarti tidak memiliki flagela. Hasil ini dapat dilihat dari tidak menyebarnya pertumbuhan bakteri pada media MRS Agar, melainkan hanya tumbuh pada bekas tusukan jarum inokulum saja.

Berdasarkan hasil uji katalase pada 15 isolat BAL menunjukkan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung

gas yang berisi oksigen ketika isolat ditetesi dengan larutan H₂O₂. Uji produksi gas dilakukan untuk melihat aktivitas metabolisme BAL. Hasil uji menunjukkan bahwa 15 isolat tersebut tidak memproduksi gas yang berarti memiliki tipe fermentasi homofermentatif. Uji ketahanan hidup bakteri pada suhu yang berbeda-beda yaitu pada suhu 10^oC – 50^oC didapatkan hasil bahwa 15 isolat BAL dapat tumbuh pada 10^oC – 40^oC. Dimana pada suhu 10^oC – 40^oC media di dalam tube berwarna keruh yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan pada suhu 45^oC - 50^oC media di dalam tube tidak berwarna keruh yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pada pH 4,5 – 8,5 semua isolat BAL (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9, AP10, AP11, AP12, AP13, AP14, dan AP15) dapat tumbuh sedangkan pada pH 9,0 semua isolat BAL tersebut tidak dapat tumbuh. Uji ketahanan hidup bakteri pada konsentrasi garam yang berbeda-beda dilakukan pada kondisi lingkungan dengan konsentrasi NaCl 5%, 6,5% dan 10%. Hasil yang didapatkan pada uji ini yaitu pada konsentrasi NaCl 5% hanya 9 isolat yang dapat tumbuh sedangkan, pada konsentrasi NaCl 6,5% dan 10% semua isolat BAL (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9,

AP10, AP11, AP12, AP13, AP14, dan AP15) dapat hidup pada konsentrasi NaCl tersebut.



Gambar 4. Hasil pewarnaan gram pada isolate bakteri dari fermentasi anggur buah pala (*Myristica fragrans* Houtt).

Selanjutnya 15 isolat BAL yang di peroleh dari hasil *screening* diidentifikasi dengan menggunakan metode *Profile Matching* pada level genus (*generic assignment*) yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Sneath, dkk, 1987). Hasil karakterisasi dan identifikasi genus (*generic assignment*) menunjukkan bahwa 15 isolat BAL yang diperoleh dari sampel anggur buah pala tergolong dalam anggota genus *Lactobacillus*. Ke-15 Isolat BAL memiliki karakter fenotipik antara lain bentuk sel batang, susunan sel tunggal, reaksi gram positif, non motil, tidak membentuk spora, katalase negatif, tipe fermentasi homofermentatif, sehingga diduga kuat merupakan anggota genus *Lactobacillu..* Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa ke-15 isolat BAL memiliki karakter yang hampir sama dengan karakter strain *Lactobacillus bulgaricus*. Sehingga 15 isolat BAL tersebut diduga kuat merupakan spesies *Lactobacillus bulgaricus*.

Penggunaan strain acuan pada tahap identifikasi berfungsi sebagai pembanding sehingga akurasi hasil identifikasi dapat dipertanggung jawabkan (Lawalata, 2012).

Kesimpulan

Isolasi BAL dari fermentasi anggur buah pala diperoleh 15 isolat bakteri. Berdasarkan *screening* yang dilakukan, semua isolat tersebut merupakan Bakteri

Asam Laktat (BAL). 15 isolat bakteri yang diisolasi dari fermentasi anggur buah pala dapat memproduksi ekso polisakarida. Berdasarkan identifikasi dengan menggunakan metode *profile matching*, dapat diketahui bahwa 15 isolat tersebut termasuk dalam anggota genus *Lactobacillus* dan merupakan Spesies *Lactobacillus bulgaricus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Fuller, B. (2008). Probiotics in Man and Animals. *Journal Application Bacteriol.* 66 (1): 365-378.
- Lawalata J. H. (2012). Rekayasa proses ekstraksi kulit buah langsung (*Lansium domesticum var Lansat*) sebagai bahan antibakteri dan antioksidan. *disertasi*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurdjanah, N. (2007). *Teknologi Pengolahan Pala*. Departemen Pertanian. Bogor. Cetakan Pertama.
- Rismunandar. (1990). *Budidaya dan Tataniaga Pala*. PT. Penebar Swadaya. Jakarta. Cetakan Kedua.
- Handayani. 2009. Pencarian Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida yang mempunyai Aktivitas Fruktansukrase dari Koleksi Isolat asal Sumber Lokal. *Skripsi*. Universitas Indonesia.
- Widyastuti, Y. S. Ratnakomala, & F. Ekawati. (1998). Bakteri Asam Laktat pada Buah-buahan Tropis. [Laporan Penelitian]. Cibinong-Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.
- Sneath, P. H. A, N. S. Mair., Sharpe M. E., & Holt. J. G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 66(2): 256-263.