****

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Anggur Buah Pala (Myristica fragrans Houtt) Sebagai Penghasil Eksopolisakarida**

Elma Fridayanti Kansile, H. J. Lawalata, Christny, Rompas

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 diduga merupakan salah satu habitat alami bakteri, termasuk bakteri asam laktat (BAL). Penelitian ini bertujuan 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 : Isolasi, Identifikasi, Anggur buah pala (Myristica fragrans Houtt), 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 believed to be one of the natural habitats of bacteria, including lactic acid bacteria (BAL). The study aims 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.****Keyword : Isolation, Identification, nugmeg grapes (myristica fragrans houtt), lactic acid 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 jenis 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).

 Pala (*Myristica fragrans* Houtt*)* dikenal sebagai tanaman rempah yang memiliki nilai ekonomis dan dimanfaatkan dalam industri. Pada saat panen pala yang paling banyak dimanfaatkan secara ekonomis adalah biji dan fuli karena kedua bahan ini yang laku dijual dan bernilai tingi sedangkan daging buahnya dibuang sehingga akan menjadi limbah dan dapat mencemarkan lingkungan padahal daging buah pala memiliki nilai ekonomis. Daging buah pala ini 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 (Nurdjanah, 2007).

 Minuman anggur adalah minuman beralkohol hasil fermentasi alkohol khamir terhadap gula-gula glukosa dan fruktosa yang terdapat dalam buah. Khamir dapat tumbuh baik pada keadaan sangat asam (pH 3-4) dalam sari buah dan dapat tahan terhadap sulfurdioksida yang ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk. Fermentasi gula (Sukrosa) oleh khamir dapat mengalihkan etil alkohol (etanol) dan CO2. Dalam fermentasi khamir ini pH produk akan menurun karena terjadinya pembentukan CO2, dan asam, misalnya asam sitrat, asam ketoglutarat, asam laktat dan sebagainya (Nurdjanah, 2007).

 Dalam pembuatan minuman anggur buah pala, jenis starter ragi yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* (ragi roti). *Rhizopus oligosporus* (ragi tempe) dan *Amylomyces rouxii* (ragi tape), adapun bahan campuran yang perlu ditambahkan dalam pembuatan minuman anggur ini adalah sukrosa (gula tebu/gula pasir). Pada pembuatan minuman anggur buah pala ini ditambahkan kecaambah kacang hijau (touge). Sumber nitrogen yang dapat digunakan dalam pertumbuhan mikroba dapat berasal dari nitrogen organik misalnya protein, ekstrak kecambah kacang hijau maupun nitrogen organik seperti ammonium

sulfat. Biji kacang hijau termasuk biji-bijian sumber vitamin A, vitamin B, dan vitamin C (Nurdjannah, 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. Fermentasi secara teknik dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau parsial anaerobik karbohidrat yang yang menghasilkan alkohol serta beberapa asam. Fermentasi sendiri berasal dari bahasa latin “ferfere” yang berarti mendidihkan, sedangkan menurut ilmu kimia yaitu terbentuknya gas-gas CO 2 dari suatu cairan kimia. Gula seperti glukosa, fruktosa dan sukrosa sebagai bahan dasar ketika difermentasi dalam kondisi anaerob akan menghasilkan etanol, asam laktat, asam butirat, aseton, dan hirogen. Proses fermentasi ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan kondisi asam atau penurunan pH. Penurunan pH yang terjadi ini mengindikasikan adanya aktifitas mikroba dalam menguraikan karbohidrat (Fuller, 2008).

 Beberapa jenis BAL dapat mensintesis *Extracellular polysaccharidae* 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). EPS juga berperan dalam rasa dimulut, tekstur, dan persepsi rasa dari produk fermentasi. Selain itu, EPS memiliki efek kesehatan karena mempunyai aktivitas imunostimulator, antitumor, dan aktivitas makrofag serta limfosit untuk meningkatkan ketahanan tubuh. Eksopolisakarida juga merupakan probiotik karena disintesis oleh BAL. Probiotik merupakan mikroba hidup yang dapat mempengaruhi kesehatan dengan cara menyeimbangkan mikroba dalam usus serta menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Adanya asam laktat sebagai metabolit bakteri asam laktat dapat menghalangi pertumbuhan bakteri patogen (Handayani, 2009).

**METODE**

**Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini 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 (*Myristica fragrans* Houtt), 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, malachite green, kertas label, plastik warp, aluminium foil, plastik tahan panas, karet gelang, tissue, kapas dan aquades.

**Prosedur Penelitian**

1. 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.

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

 Alat dan Bahan disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Sterilisasi dilakukan di Autoclaf selama 15 menit pada suhu 1210C.

1. Pembuatan Media MRSA dan MRSB
2. Pembuatan Media MRSA

Untuk membuat media MRSA sebanyak 250mL 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.

1. Pembuatan Media MRSB

Untuk membuat media MRSB sebanyak 150mL 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 selama15 menit.

1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

 Sebanyak 1mL anggur buah pala disuspensikan kedalam aquades steril. Dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10-9.Pengenceran 10-7, 10-8 dan 10-9 plating dengan metode pour plate dalam media MRSA + CaCO3. 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 (stok).

1. 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).

1. Produksi Eksopolisakarida Kasar

 15 mL 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**

1. **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.

1. ***Screening* Bakteri Asam Laktat**

 Berdasarkan *screening* yang dilakukan didapatkan hasil bahwa 15 isolat penghasil asam diduga kuat sebagai Bakteri Asam Laktat (BAL) berdasarkan kriteria (a) bersifat gram positif, (b) sel berbentuk batang, (c) tidak membentuk spora, (d) katalase negatif, (e) non motil (f) 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).

1. **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 eksoplisakarida yang diperoleh oleh masing-masing isolat bakteri asam laktat (BAL) berbeda-beda. Produksi

eksopolisakarida terendah adalah 60mg/L sedangkan produksi eksopolisakrida tertinggi adalah 1260mg/L. Kemampuan memproduksi EPS suatu isolat pada umumnya dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor genetis dan faktor lingkungan.



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**

1. **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. 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 100C – 500C didapatkan hasil bahwa 15 isolat BAL dapat tumbuh pada 100C – 400C. Dimana pada suhu 100C – 400C media di dalam tube berwarna keruh yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan pada suhu 450C - 500C media di dalam tube tidak berwarnah 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 iolat 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 konentrasi NaCl tersebut.



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

Selanjutnya 15 isolat BAL yang di peroleh dari hasil *screening* didientifikasi dengan menggunakan metode *Profile Matching* pada level genus (*generic assignment*) yang mengacu pada *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology* (Sneath *et al*., 1987). Hasil karakterisasi dan identifikasi genus (*generic assignment*)

menunjukkan bahwa 15 isolat BAL yang diperoleh dari sampel anggur buah pala tergolong dalam angota 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 hasi pengamatan menunjukan bahwa ke-15 isolat BAL memiliki karakter yang hampir sama denga 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 eksopolisakarida.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. (2008). Probiotics in Man and Animals. Journal Application Bacteriol. Vol. 66 No. 1: 365-378.

Lawalata VN. (2012). Rekayasa proses ekstrasi kulit buah langsat (*Lansium domesticum varLansat)* sebagai bahan antibakteri dan antioksidan [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

Nurdjanah. (2007). Teknologi Pengolahan Pala. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bogor.

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, and F. Ekawati. (1998). Bakteri Asam Laktat pada Buah-buahan Tropis. [Laporan Penelitian]. Cibinong-Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.