

IDENTIFIKASI GENUS BAKTERI ASAM LAKTAT DARI NIRA AREN TERFERMENTASI SPONTAN

GENUS IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTED PALM (*Arenga pinnata*) SAP

Syahidah Bannan Qonita¹, Vonny Setiaries Johan², Rahmayuni²

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Pertanian,

Fakultas Pertanian, Universitas Riau, Kode Pos 28293, Pekanbaru

syahidahqonita@gmail.com

ABSTRACT

Palm sap contain sugar and other nutritional components that are good for the growth of microorganism, one of which lactic acid bacteria (LAB). The purpose of this research was to isolate and identify lactic acid bacteria genus from fermented sap of *Arenga pinnata*. Lactid acid bacteria were isolate in MRS agar supplemented with CaCO₃ 0.2%. Identificatied morphologically including Gram staining, shape cell observation, catalase test and gases production from glucose test. Fourteen isolates were able to produce clear zone in MRS agar which supplemented by CaCO₃ 0.2%. The identification results showed that the fourteen isolates were Gram positive, basil form and coccus form, catalase negative and 13 isolates belong to homofermentative and one isolate belong to heterofermentative. Further identify was then performed on the growth at different temperature (10°C, 37°C and 45°C), growth at different NaCl concentrations (4% and 6.5%) and growth at different pH (4.4 and 9.6) in 3 isolates suspected to have different characteristics. Further identify showed that all isolates can grow at temperature 10-45°C, salt concentration 0-6.5% and acid pH but can't grow in alkaline pH. Suspected of LAB isolates were belong to genus *Lactobacillus* and *Pediococcus*.

Keywords: Fermented palm sap, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Pediococcus*

PENDAHULUAN

Aren (*Arenga pinnata*) merupakan tanaman multifungsi yang hampir menyerupai pohon kelapa (*Cocos nucifera*), seluruh bagian dari tumbuhannya dapat dimanfaatkan untuk kelangsungan hidup manusia. Pemanfaatan

tanaman aren tidak hanya pada daun, buah dan batangnya, namun tanaman aren juga dapat menghasilkan nira yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Nira pada dasarnya merupakan air yang keluar dari bunga aren atau kelapa. Kabupaten Rokan Hulu Provinsi Riau terkenal dengan produksi aren yang berlimpah. Salah satu daerah penghasil nira aren di

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

Kabupaten Rokan Hulu adalah Kecamatan Rambah. Potensi tanaman aren di Kecamatan Rambah Tahun 2014 mencapai 156 hektar, dengan tanaman menghasilkan nira sekitar 90 hektar yaitu 57,69% dari persentase luas tanaman aren (Saputra, 2015).

Nira adalah suatu minuman alami yang terasa manis karena mengandung gula. Kandungan gula pada nira aren yaitu 12,30-17,4 % (Rumokoi, 1990). Nira banyak diolah secara tradisional sebagai gula aren oleh masyarakat di beberapa daerah. Nira aren yang diolah menjadi gula merah adalah nira segar. Penggunaan nira yang baik yaitu langsung dikonsumsi setelah disadap dan tidak dibiarkan bermalam karena akan mengubah citarasa. Berubahnya citarasa ini disebabkan keberadaan bakteri yang mengubah gula menjadi asam. Perubahan citarasa nira disebabkan karena mikroba memfermentasi gula pada nira tersebut (Mussa, 2014).

Kandungan gula yang cukup tinggi dan berbagai mikronutrien merupakan media tempat tumbuhnya mikroba. Nira yang belum terfermentasi pada dasarnya mengandung sejumlah mikroba baik berupa khamir maupun bakteri (Fossi, 2015). Mikroba dalam nira ini berasal dari tandan maupun udara bebas ketika proses penyadapan berlangsung. Mikroba dalam nira aren akan mendegradasi senyawa-senyawa yang ada dalam nira terutama gula dan mengubahnya menjadi alkohol. Hasil penelitian yang telah dilakukan Naiola (2008) tentang mikroba amilolitik pada nira dan laru dari Pulau Timor Nusa Tenggara Timur disimpulkan bahwa selain khamir yang berperan dalam proses produksi etanol, juga terdapat

beberapa bakteri di antaranya bakteri asam laktat dan asam asetat. Bakteri asam laktat dan asetat merupakan golongan bakteri yang mempunyai peran penting dalam mikrobiologi pangan. Bakteri asam asetat berperan aktif dalam proses oksidasi alkohol menjadi asam asetat, sedangkan bakteri asam laktat berperan dalam proses pembentukan asam laktat (Banwart, 2000).

Proses fermentasi nira aren yang melibatkan berbagai macam mikroba dapat berlangsung dalam hitungan jam. Fermentasinya terjadi secara spontan dengan pola suksesi. Suksesi adalah pergantian jenis mikroba sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi (Muharani, 2011). Mussa (2014) telah melakukan penelitian mengenai kajian tentang lama fermentasi nira aren terhadap kelimpahan mikroba dan disimpulkan bahwa jumlah bakteri lebih dominan pada waktu fermentasi 10 jam yaitu $21,0 \times 10^6$ CFU/ml. Jenis mikroba yang tumbuh selama proses fermentasi nira mengalami perubahan khususnya untuk golongan bakteri.

Salah satu mikroba yang banyak terdapat pada nira adalah bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Bakteri asam laktat biasanya digunakan sebagai pangan fungsional dan juga digunakan sebagai pengawet alami dari suatu produk pangan fermentasi. Bakteri asam laktat juga banyak digunakan sebagai probiotik yang bermanfaat untuk menjaga keseimbangan mikroba saluran cerna. Bakteri asam laktat berpotensi memberikan dampak positif bagi kesehatan dan nutrisi manusia, beberapa di antaranya yaitu meningkatkan nilai nutrisi makanan,

-
1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
 2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

mengontrol infeksi pada usus, meningkatkan digesti (pencernaan) laktosa, mengendalikan beberapa tipe kanker dan mengendalikan tingkat kolesterol serum dalam darah. Selain itu, BAL mampu mencegah pembusukan dan kontaminasi oleh mikroba lain.

Penelitian tentang isolasi BAL yang banyak dilakukan terutama pada produk susu. Selain pada produk susu, BAL banyak dijumpai pada berbagai bahan hasil pertanian, contohnya pada nira. Cahyaningsih (2006) telah melakukan penelitian mengenai isolasi dan identifikasi BAL dari nira lontar menyimpulkan bahwa terdapat empat spesies BAL pada nira lontar yang terfermentasi spontan selama 24 jam. Keempat jenis BAL itu antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum*. Hasil penelitian Naiola (2008) menyimpulkan bahwa terdapat khamir *Pichia anomala* dan bakteri asam laktat *Bacillus licheniformis* bl43, *Chromobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus roseus* dan *Bacillus coagulans* penghasil enzim amilase pada nira dan laru yang terfermentasi.

Koleksi BAL yang diisolasi dari bahan pangan lokal terutama dari nira masih terbatas jumlahnya, sehingga masih perlu dilakukan eksplorasi BAL dari nira aren untuk meningkatkan koleksi BAL. Mengingat besarnya manfaat yang dihasilkan oleh BAL. Berdasarkan kemungkinan adanya BAL yang terdapat pada nira aren terfermentasi spontan dan besarnya manfaat yang dihasilkan dari BAL, maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi BAL yang berperan

dalam proses fermentasi nira aren serta mengidentifikasi BAL yang diperoleh. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat BAL dari nira aren terfermentasi spontan selama 10 jam dan mengidentifikasi genus BAL hasil isolasi dari nira aren terfermentasi spontan.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Riau. Penelitian berlangsung selama 5 bulan yaitu bulan Maret-Juli 2017.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira aren terfermentasi spontan yang diperoleh dari Desa Kaiti Rambah Tengah Barat Kecamatan Rambah Kabupaten Rokan Hulu Provinsi Riau. Bahan kimia yang digunakan untuk isolasi dan identifikasi BAL adalah MRS broth, MRS agar, akuades, CaCO_3 , NaCl , larutan cat *Hucker's crystal violet*, larutan mordant *Lugol's iodine*, alkohol 70%, larutan safranin dan H_2O_2 . Bahan lainnya yang digunakan untuk keperluan sterilisasi antara lain detergen, aluminium foil, kapas, plastik, karet dan koran.

Peralatan gelas yang digunakan pada penelitian adalah tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, *object glass*, tabung durham, pipet tetes kaca, gelas ukur serta gelas piala. Sedangkan peralatan lainnya yang digunakan adalah mikro pipet, tip, mikroskop, jarum ose, timbangan analitik, inkubator, ruang inokulasi (*laminar-flow*), *automatic mixer*, *autoclave*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, lampu

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

bunsen, rak tabung reaksi, alat dokumentasi dan alat tulis.

Metode Penelitian

Penelitian dikerjakan dalam dua tahap percobaan yaitu tahap pertama mengisolasi BAL dari nira aren terfermentasi spontan dan tahap kedua mengidentifikasi BAL hasil isolasi hingga didapatkan genus bakteri asam laktat. Selanjutnya data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif.

Persiapan Sampel Nira Aren Terfermentasi Spontan

Nira aren yang diambil adalah nira sadapan pagi. Nira aren ditempatkan di dalam botol jar yang sebelumnya telah disterilisasi. Kemudian nira aren dibiarkan terfermentasi spontan selama 10 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup. Perlakuan ini berdasarkan penelitian Mussa (2014) yang menyatakan bahwa bakteri lebih dominan tumbuh pada fermentasi nira aren 10 jam.

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sampel nira aren terfermentasi spontan diambil sebanyak 1 ml. Kemudian dilakukan serial pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} yaitu dengan mengencerkan 1 ml suspensi sampel ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% dan dihomogenkan dengan *automatic mixer* dan hal ini dilakukan hingga pengenceran 10^{-6} . Pengenceran dilakukan untuk mengurangi padatan bakteri yang ditanam. Isolasi BAL dilakukan secara *pour plate*.

Masing-masing seri pengenceran diambil 1 ml mulai dari pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-6} dan dimasukkan ke dalam cawan petri dan diratakan dengan cara menggerakkan cawan petri

membentuk angka delapan agar sampel merata. Kemudian ditambahkan ± 15 ml media MRS agar yang telah ditambah 0,2 g CaCO_3 . Setelah medium MRS agar mengeras, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 48 jam. Koloni yang membentuk zona jernih pada media MRS agar (diduga sebagai BAL) diambil dengan jarum ose dan diinokulasikan pada medium yang sama dengan metode goresan (*spread plate*), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Metode goresan dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh koloni dengan bentuk yang seragam dan terpisah.

Identifikasi Bakteri Asam Laktat

a. Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan Gram mengacu pada Prescott (2002). Satu ose suspensi isolat diambil secara aseptis dan diletakkan di atas *object glass* dan diratakan seluas $\pm 1 \text{ cm}^2$ sehingga terbentuk lapisan sel tipis (agar memudahkan dalam pengamatan morfologi sel), kemudian preparat difiksasi dengan cara pemanasan di atas nyala spiritus dengan jarak $\pm 30 \text{ cm}$.

Preparat yang telah kering ditetesi larutan *Hucker's crystal violet* sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit, preparat selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Larutan mordan *Lugol's iodine* ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 1 menit selanjutnya dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan. Tahap selanjutnya adalah penetesan larutan alkohol 70% didiamkan selama 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Larutan

-
1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
 2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

safranin diteteskan di atas preparat dan dibiarkan selama 2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Preparat diamati di bawah mikroskop.

Sel-sel bakteri yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna larutan cat *Hucker's crystal violet* yaitu biru ungu disebut bakteri Gram positif sedangkan sel-sel yang dapat melepas larutan cat *Hucker's crystal violet* dan mengikat larutan safranin sehingga berwarna merah muda disebut bakteri Gram negatif (Pelczar dan Chan, 2005).

b. Bentuk Sel

Prosedur pengamatan bentuk sel mengacu pada Prescott (2002). Bentuk sel dapat diketahui sekaligus dengan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan dilihat di bawah mikroskop dan kemudian dapat diamati bentuk sel. Salminen (2004) menyatakan bahwa berdasarkan bentuk selnya BAL berbentuk batang dan coccus.

c. Pengujian Katalase

Prosedur pengujian katalase mengacu pada Prescott (2002). Penentuan adanya aktivitas enzim katalase diuji dengan menggunakan larutan H₂O₂. Pengujian katalase dilakukan dengan cara mengambil satu ose suspensi bakteri dan diletakkan diatas *object glass* kemudian ditetesi dengan larutan H₂O₂ sebanyak 1-3 tetes dan diamati ada tidaknya gelembung atau gas.

d. Pengujian Produksi Gas dari Glukosa

Prosedur pengujian produksi gas dari glukosa mengacu pada Prescott (2002) untuk mengetahui tipe fermentasi glukosa oleh isolat

bakteri asam laktat, dilakukan pengujian dengan melihat pembentukan gas selama inkubasi. Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi sel bakteri ke dalam tabung reaksi yang berisikan medium MRS broth dengan tabung durham yang diposisikan terbalik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jika dalam tabung durham terdapat gas berarti bakteri memfermentasi sebagian glukosa menjadi gas CO₂ selain asam.

e. Pengujian Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

Prosedur pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda mengacu pada Cappucino dan Sherman *dalam* Putri dkk. (2015). Satu ml isolat BAL berumur 24 jam diinokulasikan pada medium MRS broth 5 ml kemudian diinkubasi. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu yang berbeda yaitu 10°C, 37°C dan 45°C. Pertumbuhan ditandai dengan adanya endapan atau keruh pada tabung.

f. Pengujian Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam NaCl yang Berbeda

Prosedur pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda mengacu pada Cappucino dan Sherman *dalam* Putri dkk. (2015). Satu ml isolat BAL berumur 24 jam diinokulasikan pada masing-masing medium MRS broth 5 ml yang telah ditambahkan garam NaCl dengan konsentrasi 4%, 6,5% dan kontrol (tanpa garam) kemudian diinkubasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan ditandai dengan adanya endapan atau keruh pada tabung.

-
1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
 2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

g. Pengujian Pertumbuhan pada pH yang Berbeda

Prosedur pengujian pertumbuhan pada pH yang berbeda mengacu pada Cappucino dan Sherman *dalam* Putri dkk. (2015). Satu ml isolat BAL berumur 24 jam diinokulasikan pada masing-masing medium MRS broth 5 ml yang telah ditambahkan NaOH 0,1 N (pH 9,6), HCl 0,1 N (pH 4,4) dan kontrol. Kemudian diinkubasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan ditandai dengan adanya endapan atau keruh pada tabung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pewarnaan Gram

Berdasarkan uji pewarnaan Gram, bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok bakteri Gram positif dan kelompok bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah muda. Hasil uji pewarnaan Gram terhadap keempat belas isolat diperoleh bahwa semua isolat berwarna ungu. Hasil pewarnaan Gram disajikan pada Tabel 1.

| Kode Isolat | Warna Sel | Tipe Gram |
|-------------|-----------|-----------|
| RS. 211. 1 | Ungu | Positif |
| RS. 221. 2 | Ungu | Positif |
| RS. 212. 3 | Ungu | Positif |
| RS. 212. 4 | Ungu | Positif |
| RS. 221. 5 | Ungu | Positif |
| RS. 221. 6 | Ungu | Positif |
| RS. 222. 7 | Ungu | Positif |
| RS. 222. 8 | Ungu | Positif |
| RS. 222. 9 | Ungu | Positif |
| RS. 231. 10 | Ungu | Positif |
| RS. 231. 11 | Ungu | Positif |
| RS. 232. 12 | Ungu | Positif |
| RS. 232. 13 | Ungu | Positif |

| RS. 232. 14 | Ungu | Positif |
|-------------|------|---------|
|-------------|------|---------|

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa keempat belas isolat berwarna ungu yang berarti termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif. Bakteri asam laktat termasuk kelompok bakteri Gram positif. Surono (2004) menjelaskan bahwa variasi karakteristik BAL normal terjadi, namun yang mutlak adalah sifatnya sebagai bakteri Gram positif.

Pengamatan Bentuk Sel

Bentuk sel dapat dilihat bersamaan dengan pengamatan pewarnaan Gram yang diamati di bawah mikroskop. Berdasarkan bentuk selnya BAL terdiri dari 2 famili. Famili Lactobacillaceae yang berbentuk batang (basil) dan famili Streptococcoceae yang berbentuk bulat (coccus). Hasil pengamatan bentuk sel terhadap 14 isolat disajikan pada Tabel 2.

| Kode Isolat | Bentuk Sel |
|-------------|------------|
| RS. 211. 1 | Bulat |
| RS. 221. 2 | Batang |
| RS. 212. 3 | Batang |
| RS. 212. 4 | Batang |
| RS. 221. 5 | Batang |
| RS. 221. 6 | Bulat |
| RS. 222. 7 | Bulat |
| RS. 222. 8 | Bulat |
| RS. 222. 9 | Bulat |
| RS. 231. 10 | Batang |
| RS. 231. 11 | Batang |
| RS. 232. 12 | Batang |
| RS. 232. 13 | Bulat |
| RS. 232. 14 | Bulat |

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa 7 isolat mempunyai bentuk batang dan 7 isolat mempunyai bentuk bulat. Isolat yang berbentuk batang termasuk Famili Lactobacillaceae

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

dan isolat yang berbentuk bulat termasuk dalam Famili Streptococcoceae. Genus BAL yang berbentuk batang adalah golongan Lactobacillus dan genus BAL yang berbentuk bulat antara lain adalah Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus dan Streptococcus. Ray (2001) menyatakan bahwa Lactobacillus memiliki ciri-ciri yaitu selnya berbentuk batang dengan ukuran dan bentuk yang sangat beragam. Beberapa bisa sangat panjang dan beberapa lainnya bersifat batang bulat atau batang pendek.

Pengujian Katalase

Uji katalase merupakan uji untuk mengidentifikasi mikroba yang mampu menghasilkan enzim katalase. Penentuan ada tidaknya enzim katalase dibuktikan dengan terbentuk atau tidaknya gelembung udara (O₂) pada saat isolat yang ditetesi larutan H₂O₂. Hasil uji katalase isolat BAL dari nira aren terfermentasi spontan disajikan pada Tabel 3.

| Kode Isolat | Pembentukan Gelembung | Tipe Katalase |
|-------------|-----------------------|---------------|
| RS. 211. 1 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 221. 2 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 212. 3 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 212. 4 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 221. 5 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 221. 6 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 222. 7 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 222. 8 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 222. 9 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 231. 10 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 231. 11 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 232. 12 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 232. 13 | Tidak ada | Negatif |
| RS. 232. 14 | Tidak ada | Negatif |

Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semua isolat tidak mampu

menghasilkan enzim katalase yang berarti katalase negatif. Hal ini dibuktikan dengan tidak terbentuknya gelembung udara pada semua isolat saat ditetesi larutan H₂O₂. Salah satu kriteria BAL adalah tidak memproduksi enzim katalase (katalase negatif).

Pengujian Produksi Gas dari Glukosa

Pengujian produksi gas dari glukosa ini dilakukan untuk mengetahui tipe fermentasi dari BAL. Tipe fermentasi dari BAL yaitu homofermentatif atau heterofermentatif. Bakteri asam laktat homofermentatif tidak memproduksi gas selama inkubasi sedangkan BAL heterofermentatif menghasilkan gas selama inkubasi. Hasil uji produksi gas dari glukosa terhadap 14 isolat disajikan pada Tabel 4.

| Kode Isolat | Produksi Gas | Tipe Fermentasi |
|-------------|--------------|-------------------|
| RS. 211. 1 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 221. 2 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 212. 3 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 212. 4 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 221. 5 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 221. 6 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 222. 7 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 222. 8 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 222. 9 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 231. 10 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 231. 11 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 232. 12 | Ada | Heterofermentatif |
| RS. 232. 13 | Tidak ada | Homofermentatif |
| RS. 232. 14 | Tidak ada | Homofermentatif |

Data pada Tabel 4 menunjukkan bahwa dari 14 isolat yang diuji, 13 diantaranya bersifat homofermentatif dan satu isolat bersifat heterofermentatif. Jika terdapat gas dalam tabung durham setelah inkubasi selama 48 jam, BAL digolongkan ke dalam kelompok

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

bakteri heterofermentatif. Namun jika tidak terdapat gas dalam tabung Durham maka BAL digolongkan ke dalam kelompok bakteri homofermentatif.

Perbedaan dari kedua tipe fermentasi terletak pada kemampuan BAL dalam memanfaatkan glukosa pada proses metabolisme selnya. Salminen dkk. (2004) menyatakan bahwa BAL yang bersifat homofermentatif hanya memproduksi asam laktat melalui jalur glikolisis, sedangkan heterofermentatif selain asam laktat juga dihasilkan asam asetat, etanol dan karbondioksida (gas CO₂). Bakteri asam laktat yang tergolong homofermentatif antara lain *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* dan beberapa *Lactobacillus*. Bakteri Asam Laktat heterofermentatif yaitu *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Wissela* dan beberapa spesies dari *Lactobacillus*.

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan, diperoleh 14 isolat menunjukkan hasil Gram positif dengan sel berwarna ungu dan katalase negatif dengan tidak dihasilkannya gas ketika ditetesi larutan H₂O₂. 7 isolat BAL berbentuk batang (basil) dan 7 lainnya berbentuk bulat (coccus). Dari kemampuannya memproduksi gas dari glukosa 13 isolat bersifat homofermentatif dan satu isolat lainnya bersifat heterofermentatif. Satu isolat yang tergolong BAL heterofermentatif adalah yang berbentuk batang yaitu isolat RS. 232. 12. Sehingga isolat ini diduga sebagai BAL dari genus *Lactobacillus* yang bersifat heterofermentatif.

Hasil pengamatan secara kualitatif terhadap 14 isolat mendapatkan bahwa RS. 211. 2, RS.

212. 3, RS. 212. 4, RS. 221. 5, RS. 231. 10 dan RS. 231. 11 diasumsikan sebagai BAL dari golongan yang sama karena memiliki warna dan bentuk yang sama, yaitu *Lactobacillus* yang bersifat homofermentatif. Isolat RS. 232. 12 diduga dari genus *Lactobacillus* heterofermentatif. Sedangkan RS. 211. 1, RS. 221. 6, RS. 222. 7, RS. 222. 8, RS. 222. 9, RS. 232. 13 dan RS. 232. 14 diasumsikan sebagai genus yang sama dan belum teridentifikasi. Namun, berdasarkan karakteristik BALnya yaitu berbentuk bulat dan bersifat homofermentatif, maka genus BAL bisa berupa *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* atau *Streptococcus* (Penggolongan ini berdasarkan tabel 2.). Sehingga, dari keempat belas isolat dihasilkan tiga kelompok besar isolat BAL. Yaitu: *Lactobacillus* homofermentatif, *Lactobacillus* heterofermentatif dan BAL berbentuk bulat yang bersifat homofermentatif.

Tahapan selanjutnya, yaitu Identifikasi lanjutan terhadap ketiga kelompok besar isolat BAL. Berdasarkan penggolongan Todor (2009), untuk mengetahui genus dari setiap isolat, maka perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut meliputi pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda, pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda dan pertumbuhan pada pH yang berbeda. Dari masing-masing kelompok BAL, diambil satu contoh isolat yang kemudian akan dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik lain dari BAL. Isolat RS. 212. 4 mewakili kelompok BAL *Lactobacillus* homofermentatif, Isolat RS. 222. 7 mewakili kelompok BAL berbentuk bulat yang bersifat homofermentatif

-
1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
 2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

dan RS. 232. 12 mewakili kelompok BAL Lactobacillus heterofermentatif.

Pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda

Pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda dilakukan pada suhu 10°C, 37°C dan 45°C. Pertumbuhan BAL ditandai dengan medium yang keruh atau terdapat endapan putih di bawah tabung reaksi. Hasil pengujian pertumbuhan terhadap ketiga isolat BAL pada suhu yang berbeda disajikan pada Tabel 5.

| Kode Isolat | Petumbuhan pada suhu | | |
|-------------|----------------------|--------|--------|
| | 10° | 37° | 45° |
| RS. 212. 4 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |
| RS. 222. 7 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |
| RS. 232. 12 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |

Bakteri asam laktat merupakan bakteri mesofilik, yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada rentang suhu 10-45°C. Suhu optimum bagi pertumbuhan BAL adalah 10-45° C (Putri, 2015). Bakteri asam laktat yang dapat tumbuh pada suhu 10°C dan 45°C di antaranya Lactobacillus, Enterococcus, Leuconostoc dan Pediococcus.

Pengujian pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda

Pengujian pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda dilakukan pada konsentrasasi 4%, 6,5% dan kontrol (tanpa penambahan garam). Pertumbuhan BAL ditandai dengan medium yang keruh atau terdapat endapan putih di bawah tabung reaksi. Hasil pengujian

pertumbuhan ketiga isolat BAL pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda disajikan pada Tabel 6.

| Kode Isolat | Petumbuhan pada konsentrasi garam NaCl | | |
|-------------|--|--------|--------|
| | Kontrol | 4% | 6,5% |
| RS. 212. 4 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |
| RS. 222. 7 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |
| RS. 232. 12 | Tumbuh | Tumbuh | Tumbuh |

Berdasarkan Tabel 6, dapat dilihat bahwa ketiga isolat dapat tumbuh pada konsentrasi garam 0-6,5%. Pertumbuhan ditandai dengan kekeruhan pada medium dan terbentuknya endapan pada bagian bawah tabung reaksi. Menurut Fardiaz (2014) mikroba yang tergolong halofilik ringan dapat tumbuh dengan baik pada konsentrasi garam 2-5%, halofilik sedang tumbuh dengan baik pada konsentrasi 5-20%, sedangkan halofilik ekstrem dapat tumbuh dengan baik pada konsentrasi garam 20-30%.

Pengujian Pertumbuhan pH yang Berbeda

Nilai pH medium merupakan salah satu parameter penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba. Pengujian pertumbuhan pada pH yang berbeda dilakukan pada pH asam (4,4), basa (9,6) dan kontrol (tanpa penambahan asam dan basa). Pertumbuhan BAL ditandai dengan medium yang keruh atau terdapat endapan putih di bawah tabung reaksi. Hasil pengujian pertumbuhan isolat BAL pada pH yang berbeda disajikan pada Tabel 7.

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

| Kode Isolat | Petumbuhan pada pH | | |
|-------------|--------------------|--------|--------------|
| | Kontrol | 4,4 | 9,6 |
| RS. 212. 4 | Tumbuh | Tumbuh | Tidak Tumbuh |
| RS. 222. 7 | Tumbuh | Tumbuh | Tidak Tumbuh |
| RS. 232. 12 | Tumbuh | Tumbuh | Tidak Tumbuh |

Berdasarkan Tabel 7, dapat dilihat bahwa ketiga isolat dapat tumbuh pada pH asam dan pH medium kontrol, namun tidak dapat tumbuh pada pH basa. Menurut Buckle dkk., (2009) BAL tumbuh optimal pada pH 5,5 – 6,0. Setiap mikroba mempunyai permeabilitas membran sitoplasma yang tidak sama sehingga mempengaruhi toleransi mikroba terhadap pH lingkungan. Bila pH lingkungan tidak sesuai untuk aktivitas enzim secara optimal, maka mikroba tidak dapat melakukan metabolisme dengan baik. Akibatnya mikroba tidak dapat tumbuh dengan optimal (Fardiaz, 2014). Berdasarkan pH, mikroba dikelompokkan menjadi golongan asidofil.

Isolat RS. 222. 7 dapat tumbuh pada suhu (10°C, 37°C dan 45°C) dan kadar garam NaCl (4% dan 6,5%) yang berbeda. Namun, tidak dapat tumbuh pada pH basa (9,6) dan dapat tumbuh pada pH asam (4,4). Berdasarkan Tabel 2, penggolongan BAL tersebut termasuk dalam genus *Pediococcus*. Bakteri dari genus *Pediococcus* banyak terdapat pada produk fermentasi sayuran, susu dan

bir yang rusak. Genus *Pediococcus* pada umumnya berbentuk tetrad, tetapi beberapa spesies *Pediococcus* membentuk 12 rantai pendek. Bakteri ini bersifat homofermentatif dan tumbuh baik pada konsentrasi garam 5,5 %. Sifat lain dari bakteri ini adalah katalase negatif, bersifat mikroaerofilik, mampu tumbuh pada kisaran suhu 7-45°C dengan suhu optimum 25-32°C.

Isolat RS. 212. 4 dan RS. 232. 12 dapat tumbuh pada suhu (10°C, 37°C dan 45°C) dan kadar garam NaCl (4% dan 6,5%) yang berbeda. Namun, tidak dapat tumbuh pada pH basa (9,6) dan dapat tumbuh pada pH asam (4,4). Berdasarkan Tabel 2, penggolongan BAL tersebut termasuk dalam genus *Lactobacillus*. Ray (2001) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri yaitu selnya berbentuk batang dengan ukuran dan bentuk yang sangat beragam, beberapa biasanya sangat panjang dan beberapa lainnya bersifat batang bulat. Bentuk sel tunggal atau rantai yang pendek sampai panjang, anaerob fakultatif, Gram positif, kebanyakan spesies tidak bergerak dan mesofilik. *Lactobacillus* merupakan genus terbesar dalam kelompok bakteri asam laktat dengan hampir 80 spesies berbeda tersebar luas di alam dan diantaranya terdapat pada beberapa produk nabati maupun hewani.

Kesimpulan

1. Hasil isolasi dan pemurnian BAL diperoleh 14 isolat menghasilkan zona jernih pada medium MRS agar + CaCO₃ 0,2%.
2. Hasil identifikasi terhadap 14 isolat menunjukkan hasil Gram positif dengan sel berwarna biru gelap atau ungu, bentuk sel batang dan bulat, katalase negatif dengan tidak dihasilkannya gas ketika ditetesi

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

- larutan H₂O₂ serta kemampuan memproduksi gas dari glukosa diperoleh 13 isolat bersifat homofermentatif dan satu isolat bersifat heterofermentatif.
- Hasil uji lanjut berdasarkan suhu, garam NaCl dan pH berbeda (dilakukan terhadap tiga isolat dari kelompok BAL yang berbeda) menunjukkan bahwa ketiga isolat dapat tumbuh pada suhu 10-45°C, konsentrasi garam NaCl 0-6,5% dan pH asam, namun tidak dapat tumbuh pada pH basa.
 - Bakteri asam laktat yang diperoleh dari 14 isolat diduga termasuk dalam golongan *Lactobacillus* dan *Pediococcus*.

Saran

Identifikasi lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui spesies BAL dan untuk mengeksplorasi potensi probiotik BAL yang diisolasi dari nira aren terfermentasi spontan.

DAFTAR PUSTAKA

- Banwart, G. J. 2000. **Basic Food Microbiology, Abridged Edition**. AVI Publishing Company. Inc. Westport. Connecticut.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet dan M. Wotton. 2007. **Ilmu Pangan**. Penerjemah H. Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Cahyaningsih, H.E. 2006. **Identifikasi bakteri asam laktat dari nira lontar serta aplikasinya dalam mereduksi *Salmonella typhimurium* dan *Aspergillus flavus* pada biji kakao**. Tesis Fakultas Pertanian Intitut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fardiaz. 1992. **Mikrobiologi Pangan 1**. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fossi, B.T., N.B. Ekue, G.T. Nchanji, B.G. Ngah, I.A. Anyangwe, S. Wanji. 2015. **Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from fermented sap of palm tree (*Elaeis guineensis*)**. Journal of Microbiology and antimicrobials. Volume 7 (5): 42-52.
- Hidayat, N., M.C. Padaga dan S. Suhartini. 2006. **Mikrobiologi Industri**. Penerbit Andi Offset. Yogyakarta.
- Mussa, R. 2014. **Kajian tentang lama fermentasi nira aren (*Arenga Pinnata*) terhadap kelimpahan mikroba dan kualitas organoleptik tuak**. Biopendix 1 (1): 54-58.
- Naiola, E. 2008. **Mikrobia amilolitik pada nira dan laru dari Pulau Timor, Nusa Tenggara Timur**. Biodiversitas. Volume 3 (3): 165-168.
- Pelczar M.J. dan E.C.S. Chan. 2005. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Diterjemahkan oleh R.S. Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo, S.L. Angka. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Prescott, H. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology**. 5th ed. Mc Graw-Hill Companies. Boston.
- Putri, B.S.P., S. Suwasono dan M. Choiron. 2015. **Identifikasi bakteri asam laktat sebagai anti kapang dari fermentasi**

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian

- kakao di Gunung Kidul Yogyakarta.** Jurnal Berkala Ilmiah Pertanian. Volume 10 (10): 2-3.
- Ray, B. 2001. **Fundamental Food Microbiology.** 3rd Edition. CRC Press LCC. Florida.
- Rumokoi, M.M.M. 1990. **Manfaat tanaman aren (*Arenga pinnata* Merr.).** Buletin Balitka No. 10: 21-28. Balai Penelitian Kelapa. Manado.
- Salminen, S., A.V. Wright dan A. Ouwehand. 2004. **Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects.** 3th edition. Revised and Expanded. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Saputra, E. 2015. **Strategi pengembangan usaha gula aren di Desa Rambah Tengah Barat Kecamatan Rambah Kabupaten Rokan Hulu.** Jurnal Penelitian Sungkai. Volume 1 (1). Universitas Pasir Pengaraian. Rokan Hulu.
- Surono, I.S. 2004. **Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan.** Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Todar, K. 2009. **Lactic Acid Bacteria.** http://textbookofbacteriology.net/Lactics_2.html. Diakses pada tanggal 17 Desember 2016.
- Zahro, F. 2014. **Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal fermentasi markisa ungu sebagai penghasil eksopolisakarida.** Skripsi Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.

1. Mahasiswa Jurusan Teknologi Pertanian
2. Dosen Pembimbing Jurusan Teknologi Pertanian