

KARAKTERISASI FENOTIPIK DAN AKTIVITAS ANTIMIKROBIA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI LIMBAH PRODUKSI TEMPE

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIA ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TEMPE PRODUCTION WASTE

Erlin Amelia Santosa¹, Endah Retnaningrum^{2,*}

¹Mahasiswa Program Sarjana, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia, 55281

*email korespondensi: endahr@ugm.ac.id

Abstrak

Selama proses pembuatan tempe, dihasilkan limbah cair berupa air rendaman kedelai yang mengandung berbagai jenis Bakteri Asam Laktat (BAL). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter fenotipik dan aktivitas antimikrobia BAL dari limbah produksi tempe. Isolat BAL yang terdapat pada limbah produksi tempe dikarakterisasi secara morfologis, biokimiawi dan fisiologis untuk selanjutnya dianalisis dengan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pengujian aktivitas antimikrobia dilakukan dengan metode *spot on the lawn* dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode One Way Anova (taraf kepercayaan 95%). Diperoleh empat isolat BAL, dimana strain ES1B dan ES1G teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum*, sedangkan strain ES1F dan ES2D teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Seluruh isolat BAL menunjukkan aktivitas antimikrobia terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan daya hambat rendah, kecuali strain ES2B dan ES1G yang menunjukkan daya hambat sedang terhadap *Escherichia coli* (zona hambat sebesar $16,33 \pm 1,53$ mm dan $17,0 \pm 1,0$ mm).

Kata kunci: Antimikrobia, karakterisasi, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, limbah produksi tempe

Abstract

In the process of making tempe produced a liquid waste which contains various types of Lactic Acid Bacteria (LAB). This study aims to determine the phenotypic characters and antimicrobial activity of LAB from tempe production waste. LAB isolates were characterized morphologically, biochemically and physiologically for further analysis using the profile matching method which refers to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Antimicrobial activity testing was carried out using the spot on the lawn method and statistically analyzed using the One Way Anova method (95% confidence level). There were four LAB isolates, which ES1B and ES1G strain were identified as *Lactobacillus fermentum*, whereas ES1F and ES2D were identified as *Lactobacillus plantarum*. All LAB isolates had antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with low inhibition, except ES2B and ES1G which showed moderate inhibition against *Escherichia coli* (zone of inhibition of 16.33 ± 1.53 mm and 17.0 ± 1.0 mm).

Keywords: Antimicrobial, characterization, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, tempe production waste

Pendahuluan

Fermentasi merupakan salah satu teknik yang umum digunakan untuk mengolah berbagai sumber pangan. Tidak hanya berguna untuk meningkatkan kualitas nutrisi dan cita rasa dari produk makanan, proses fermentasi berguna dalam menjaga kualitas dan ketahanan produk makanan terhadap kontaminasi mikrobial perusak [1]. Prinsip fermentasi adalah penyederhanaan senyawa organik menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh enzim yang dihasilkan mikrobial. Kelompok mikrobial yang umum terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, yeast dan jamur [2]. Tempe merupakan salah satu makanan yang melibatkan fermentasi dalam proses pembuatannya. Tidak hanya dilangsungkan oleh jamur (*Rhizopus sp.*),

proses fermentasi pada tempe juga melibatkan peran Bakteri Asam Laktat (BAL).

Terdapat beberapa tahapan yang harus dilakukan dalam kegiatan produksi tempe. Tahapan dapat dibagi menjadi tahapan penyesuaian lingkungan sebelum proses fermentasi oleh kapang dan tahapan menuju fermentasi oleh kapang. Tahapan pembuatan tempe diawali dengan pencucian dan perebusan kedelai yang bertujuan agar diperoleh kedelai bersih yang telah terhidrasi untuk selanjutnya memudahkan proses pengupasan kulit kedelai. Pengupasan kulit bertujuan untuk memudahkan miselium kapang untuk menembus ke dalam jaringan pada kedelai. Dilakukan pula tahap pencucian kedua dan perendaman dalam air pada suhu kamar selama 22-24 jam. Perendaman

ini bertujuan agar Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat tumbuh secara alami sehingga diperoleh kondisi asam yang sesuai dengan kondisi pertumbuhan jamur tempe. Kelompok BAL sendiri akan memproduksi asam dari jalur fermentasi asam laktat. Dilakukan kembali proses proses perebusan dan penirisan. Tahapan kemudian ditutup dengan peragian dan pembungkusan kedelai setelah kedelai dingin agar proses fermentasi oleh kapang selanjutnya dapat berlangsung [3].

Dalam proses pembuatan tempe, diproduksi limbah cair berupa air rendaman kedelai yang dihasilkan pada tahap perendaman. Limbah cair berupa air rendaman kedelai ini mengandung beragam jenisnya BAL. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang mampu melakukan proses fermentasi karbohidrat menjadi asam laktat. Kelompok mikrobia ini telah digunakan sebagai kultur starter dalam fermentasi makanan karena dinilai mampu meningkatkan kualitas, lama masa simpan, keamanan, kandungan nutrisi serta rasa secara keseluruhan dari produk makanan tersebut [4]. Selain asam laktat, terdapat beberapa produk sampingan yang dapat dihasilkan oleh kelompok BAL seperti asetat, ethanol, CO₂, format dan suksinat [5].

Salah satu produk yang mampu dihasilkan oleh kelompok BAL ialah senyawa-senyawa yang memiliki potensi sebagai agen antimikrobia. Beberapa senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh BAL meliputi asam laktat, asam asetat, alkohol, aldehid dan bakteriosin. Terdapat dua kelompok utama dari antimikrobia yang diproduksi oleh BAL yang terdiri dari substansi dengan massa molekular rendah (<1000 Da) dan substansi dengan massa molekular tinggi (>1000 Da) [6]. Senyawa antimikrobia dari BAL yang umum dikenal adalah asam organik. Asam organik memiliki efek penghambatan dengan mekanisme pembentukan molekul yang tidak terikat sehingga molekul tersebut selanjutnya mampu berdifusi melalui membran sel ke sitosol yang bersifat lebih basa untuk mengganggu fungsi metabolik yang penting pada sel mikrobia patogen [7].

Sebagian besar spesies BAL heterofermentatif diketahui mampu memproduksi flavoprotein oksidase yang dapat mengkatalis reduksi oksigen dan menyebabkan akumulasi hidrogen peroksida. Aktivitas antimikrobia dari hidrogen peroksida mampu melangsungkan proses oksidasi yang cukup kuat sehingga mampu merusak struktur molekul dasar protein sel mikrobia patogen [8]. Sebagian besar kelompok BAL heterofermentatif diketahui mampu menghasilkan asetaldehid aktif yang dapat berperan dalam mengatur pertumbuhan kontaminan

bersamaan dengan metabolit antimikrobia apabila konsentrasinya lebih rendah dari yang dibutuhkan untuk menghambat mikrobia tak diinginkan [9].

Disamping senyawa-senyawa kimia yang memiliki potensi sebagai antimikrobia, CO₂ pun menjadi salah satu produk akhir yang mampu dihasilkan oleh kelompok BAL. CO₂ berpotensi menjadi salah satu agen antimikrobia karena selain memiliki aktivitas antimikrobia, CO₂ dapat membuat lingkungan anaerob dengan mengganti oksigen molekular yang ada. Aktivitas antifungal dari CO₂ yang dipengaruhi pengambatan dekarboksilasi enzimatis dan akumulasinya dalam membran lipid ganda mampu menyebabkan disfungsi permeabilitas sel mikrobia patogen [10]. Beberapa kelompok BAL diketahui mampu menghambat pertumbuhan dari beberapa bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophyla*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella* [11].

Bakteriosin menjadi salah satu produk yang dihasilkan oleh kelompok BAL dan memiliki potensi antimikrobia. Bakteriosin merupakan substansi protein antibakteri dengan aktivitas bakterisidal yang melawan spesies yang berkerabat (*narrow spectrum*) atau antar genera (*broad spectrum*). Bakteriosin yang diproduksi BAL merupakan peptida antimikrobia kecil atau protein dengan spektrum penghambatan yang luas. Spektrum antibakteri yang dimiliki oleh BAL mencakup organisme pembusuk dan patogen bawaan makanan seperti *Listeria monocytogenes* dan *Staphylococcus aureus* [12]. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jenis BAL berdasarkan karakteristik fenotipik (morfologis, biokimia dan fisiologis) yang terdapat pada limbah produksi tempe serta untuk mengetahui aktivitas antimikrobia yang dihasilkan oleh kelompok BAL tersebut dalam menghambat aktivitas dan pertumbuhan dari beberapa bakteri patogen uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*).

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode profil matching yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* untuk melakukan karakterisasi fenotipik pada tiap isolat yang diperoleh. Pengujian aktivitas antimikrobia pada tiap isolat selanjutnya dilakukan dengan metode spot on the lawn. Hasil pengujian aktivitas antimikrobia dianalisis secara statistik menggunakan SPSS dengan metode *One Way Anova* (taraf kepercayaan 95%). Pengambilan sampel penelitian ini dilakukan di salah satu rumah

produksi tempe yang terletak di Gantiwarno, Klaten, Jawa Tengah. Berbagai uji dan pengamatan untuk melihat karakterisasi fenotipik dan aktivitas antimikrobia BAL dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian berlangsung pada bulan Januari 2020-Agustus 2020.

Tahapan penelitian diawali dengan isolasi dan purifikasi BAL yang terdapat pada limbah produksi tempe. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam larutan pengencer *Alkaline Peptone Water* dan dilakukan seri pengenceran hingga pada tingkat 10⁻⁵, 10⁻⁶, dan 10⁻⁷. Sebanyak 0,1 mL sampel diinokulasikan pada *medium de Man Ragosa and Sharpe Agar* (MRSA) yang telah disuplementasi CaCO₃ 1% dengan metode *pour plate*. Koloni BAL dapat dikenali dengan adanya zona jernih yang terbentuk di sekelilingnya. Koloni BAL dengan karakter tipe, ukuran, dan bentuk yang berbeda kemudian dimurnikan pada medium MRSA yang telah disuplementasi CaCO₃ 1% dengan metode *streak plate* untuk memperoleh koloni murni. Koloni murni selanjutnya disubkultur pada medium MRSA miring sebagai stok kultur.

Karakterisasi morfologis makroskopis BAL dilakukan dengan mengamati kenampakan dan karakter koloni meliputi bentuk, elevasi, tepi, dan struktur dalam koloni. Karakterisasi morfologi mikroskopis BAL dilakukan dengan pewarnaan gram. Ulasan BAL pada gelas benda ditetesi dengan sebanyak 2-3 tetes gram A (kristal violet), gram B (larutan lugol), gram C (larutan alkohol-aseton) dan gram D (safranin) dengan setiap proses penetasan didiamkan selama 5 menit, 1 menit, 1 menit dan 1 menit. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (100x) untuk diketahui bentuk dan jenis gram dari tiap isolat BAL. Untuk melihat kemampuan tiap isolat BAL dalam memproduksi spora dengan pewarnaan endospora. Ulasan BAL pada gelas benda ditetesi dengan sebanyak 2-3 tetes pewarna *malachite green* dan *safranin* dengan masing-masing proses penetasan didiamkan selama 5 menit dan 1 menit. Preparat dapat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (100x) untuk dapat diketahui bentuk, warna dan letak spora (bila ada).

Karakterisasi biokimiawi berupa uji produksi indol dan produksi H₂S dilakukan dengan menginokulasi tiap isolat BAL secara tusukan pada medium *Sulfide Indole Motility* (SIM) untuk ditetesi *reagen Ehrlich*. Hasil positif uji ini ditandai dengan perubahan warna pada lapisan permukaan atas medium menjadi merah untuk uji produksi indol dan adanya endapan berwarna hitam pada medium untuk uji produksi H₂S. Karakterisasi

biokimiawi berupa uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menginokulasi tiap isolat BAL pada medium Nutrien Broth (NB) yang telah ditambahkan 5 g/L sumber karbon (glukosa, laktosa, sukrosa, galaktosa, manitol, maltosa, , dan xylosa) serta diberi indikator *phenol red* dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham. Hasil positif uji ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna medium menjadi kuning (homofermentatif) dan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham (heterofermentatif).

Karakterisasi fisiologis berupa pengamatan motilitas bakteri dilakukan dengan menginokulasi tiap isolat BAL secara tusukan pada medium SIM untuk dapat diketahui motilitasnya. Bakteri dikatakan motil, jika pertumbuhan bakteri pada medium menyebar dan keluar area tusukan, sementara dikatakan non-motil jika pertumbuhan bakteri pada medium hanya terjadi pada daerah tusukan. Karakterisasi fisiologis berupa uji katalase dilakukan dengan meneteskan 1-2 tetes H₂O₂ di atas koloni bakteri yang telah diratakan pada gelas benda. Hasil positif uji ini ditandai dengan terbentuknya gelembung pada area koloni bakteri. Untuk melihat pengaruh variasi suhu terhadap pertumbuhan bakteri, isolat BAL diinokulasi pada medium MRSB dan diinkubasi setiap suhu 10°C, 25°C, 37°C, 45°C, dan 55°C. Untuk melihat pengaruh variasi pH terhadap pertumbuhan bakteri, isolat BAL diinokulasi pada *medium de Man Ragosa and Sharpe Broth* (MRSB) dengan pH 4, 6, 8, dan 9,6. Untuk melihat pengaruh variasi kadar garam terhadap pertumbuhan bakteri, isolat BAL diinokulasi pada medium MRSB dengan kadar NaCl sebanyak 4%, 6,5%, 10%, dan 15%. Pertumbuhan bakteri pada medium MRSB ditandai dengan peningkatan kekeruhan pada medium. Seluruh karakter fenotipik yang diperoleh digunakan untuk melakukan karakterisasi fenotipik terhadap tiap isolat BAL dengan metode *profil matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Uji aktivitas antimikrobia sel pada isolat BAL dilakukan menggunakan metode *spot on the lawn* [13]. Isolat BAL diinokulasikan pada medium MRSB selanjutnya 25 µL isolat BAL ditetaskan pada tiap sumuran medium Nutrien Agar (NA). Terdapat maksimum 4 titik spot pengujian (sumuran) dalam satu petri (jarak per titik 3 cm). Medium NA yang digunakan kali ini tersusun dari NB dan agar sebanyak 2% dengan di dalamnya terdapat sebanyak 100 µL bakteri patogen uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) yang diinokulasikan secara *pour plate*. Pada penelitian ini digunakan kontrol positif berupa antibiotik

kloramfenikol. Adanya aktivitas penghambatan antibakteri pada BAL ditandai dengan terbentuknya zona jernih/halo di sekitar sumuran. Terdapat beragam tingkat dari derajat penghambatan berdasarkan zona halo yang terbentuk, dimana tergolong ke dalam tingkat rendah jika zona halo berukuran $5 \text{ mm} < \emptyset < 15 \text{ mm}$; sedang $15 \text{ mm} \leq \emptyset < 25 \text{ mm}$; kuat $25 \text{ mm} \leq \emptyset < 35 \text{ mm}$ atau sangat kuat $35 \text{ mm} \leq \emptyset < 45 \text{ mm}$ [13]. Hasil pengujian aktivitas antimikrobia dianalisis menggunakan metode *One Way Anova* (taraf kepercayaan 95%).

Hasil dan Diskusi

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Limbah produksi tempe yang digunakan telah difermentasi pada durasi yang bervariasi, yakni selama satu malam, dua malam, dan tiga malam. Sampel ini diisolasi pada medium untuk mengetahui koloni BAL yang terdapat didalamnya.



Gambar 1. Zona jernih (halo) yang terbentuk disekeliling koloni Bakteri Asam Laktat (BAL)

Koloni BAL yang tumbuh pada medium dapat dikenali dengan adanya zona jernih. Terbentuknya zona jernih dikarenakan produksi asam organik oleh BAL yang dapat melarutkan CaCO_3 pada medium (Gambar 1). Diperoleh total isolat BAL 22 isolat setiap 10 isolat dari limbah produksi tempe dengan masa fermentasi 1 malam, 8 isolat dari limbah produksi tempe dengan masa fermentasi 2 malam, dan 4 isolat dari limbah produksi tempe dengan masa fermentasi 3 malam. Durasi fermentasi dan jumlah isolat berbanding terbalik. Hal ini terjadi karena akumulasi produk akhir berupa asam oleh BAL membuat kondisi lingkungan menjadi semakin kurang menguntungkan bagi BAL. Diperoleh 4 isolat murni, yakni dari koloni B pada durasi fermentasi malam ke-1 (ES1B), koloni F pada durasi fermentasi malam ke-1 (ES1F), koloni G pada durasi fermentasi malam ke-1 (ES1G), dan koloni D pada durasi fermentasi malam ke-1 (ES2D).

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi morfologis bakteri diperlukan di dalam penelitian ini untuk dapat mengidentifikasi jenis BAL berdasarkan dengan karakter bentuk koloni maupun sel yang dimilikinya. Karakterisasi morfologis BAL yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi makroskopis (koloni) dan morfologi mikroskopis (morfologi sel dan endospora). Karakterisasi morfologi makroskopis dilakukan dengan mengamati secara langsung kenampakan dari setiap koloni BAL yang terbentuk pada medium tumbuh. Karakterisasi morfologis mikroskopis dilakukan dengan mengamati kenampakan sel dari setiap isolat BAL di bawah mikroskop. Adapun karakter mikroskopis yang diamati adalah jenis gram dari BAL dan keberadaan endospora yang dilakukan dengan pewarnaan gram dan endospora. Kelompok bakteri gram positif dan negatif dapat dibedakan dengan melihat warna sel bakteri dengan bantuan mikroskop setelah dilakukan tahapan pewarnaan gram. Kelompok bakteri gram positif memiliki sel yang terpulas ungu dan kelompok bakteri gram negatif memiliki sel yang terpulas merah [14]. Adapun endospora akan tampak sebagai struktur sel yang terpulas hijau [15].

Koloni BAL yang diperoleh dari limbah produksi tempe memiliki warna putih susu (ES1F dan ES1G) dan putih kekuningan (ES1B dan ES2D). Jenis elevasi yang dimiliki oleh koloni BAL tersebut terdiri dari *raised* (ES1B dan ES1G) dan *convex* (ES1F dan ES2D). Jenis struktur dalam koloni yang dimiliki oleh koloni BAL tersebut terdiri dari *translucent* (ES1B dan ES1G) dan *opaque* (ES1F dan ES2D). Untuk bentuk dan struktur dalam koloni yang dimiliki oleh keempat koloni BAL tersebut seluruhnya seragam, yakni *circular* dan *entire*. Keempat isolat BAL yang diperoleh termasuk ke dalam kelompok bakteri gram positif. Hal ini diketahui dari sel bakteri yang tampak terpulas ungu, dan memiliki bentuk sel batang (bacil) dengan bentuk yang cukup bervariasi. Diketahui pula tidak terdapat endospora yang terpulas hijau pada keempat isolat BAL ini, sehingga seluruh isolat BAL juga tidak memproduksi spora (*non-spore forming*).

Karakterisasi biokimiawi bakteri diperlukan untuk dapat mengidentifikasi BAL berdasarkan dengan aktivitas dan proses biokimia yang terjadi. Karakterisasi biokimiawi yang dilakukan meliputi uji produksi indol, uji produksi H_2S dan fermentasi karbohidrat. Indol terbentuk ketika kandungan triptofan dalam medium SIM terdegradasi dan bereaksi dengan enzim *tryptophanase* yang

diproduksi bakteri [16]. Adapun produksi H₂S diandai dengan terbentuknya besi sulfid yang tampak sebagai endapan hitam pada bagian permukaan bawah medium [17]. Keempat isolat BAL diketahui tidak memproduksi indol sebab tidak terjadi perubahan warna pada permukaan atas medium menjadi merah ketika ditetesi dengan reagen Erlich. Keempat isolat BAL diketahui tidak memproduksi H₂S sebab tidak terbentuk endapan hitam pada bagian bawah medium. Untuk fermentasi karbohidrat, seluruh isolat BAL diketahui mampu melakukan fermentasi pada berbagai jenis sumber karbon sebab mampu mengubah warna seluruh medium NB yang semula merah menjadi menjadi oranye kekuningan. Perubahan warna pada medium menunjukkan adanya produksi asam dari proses fermentasi karbohidrat oleh isolat-isolat BAL tersebut. Terlihat pula adanya produksi gas pada beberapa tabung Durham di beberapa isolat BAL. Gas yang terdapat pada tabung Durham merupakan hasil akhir proses fermentasi yang berupa CO₂ [18]. Isolat BAL yang mampu mengubah warna dari medium sekaligus menghasilkan gas pada proses fermentasi karbohidrat dikelompokkan ke dalam kelompok BAL dengan sifat heterofermentatif yang mampu menghasilkan produk akhir lebih dari satu jenis [19]. Dengan demikian, keempat isolat BAL ini tergolong ke dalam kelompok fakultatif heterofermentatif (ES1F dan ES2D) serta heterofermentatif (ES1B dan ES1G).

Karakterisasi fisiologis bakteri diperlukan di dalam penelitian ini untuk dapat mengidentifikasi BAL berdasarkan dengan aktivitas selnya. Karakterisasi fisiologis yang dilakukan meliputi uji motilitas isolat BAL, uji aktivitas katalase isolat BAL serta pengamatan terhadap pertumbuhan isolat BAL dengan adanya berbagai tingkat variasi meliputi suhu, pH dan kadar garam (NaCl). Keempat isolat BAL diketahui bersifat non-motil karena seluruh isolat menunjukkan pertumbuhan pada medium hanya pada area tusukan dan tidak menyebar keluar dari area tersebut. Keempat isolat BAL ini juga diketahui memiliki aktivitas katalase negatif karena tidak terbentuk gelembung pada tetesan hidrogen peroksida pada seluruh isolat. Untuk pertumbuhan bakteri pada variasi faktor tumbuh yang berbeda, seluruh isolat BAL menunjukkan hasil yang bervariasi pula. Untuk pengamatan terhadap pertumbuhan dengan berbagai variasi pada suhu, keempat isolat BAL ini menunjukkan hasil yang berbeda pada setiap suhu. Suhu optimum untuk pertumbuhan isolat BAL berada pada nilai 25°C dan 37°C, dimana pertumbuhan BAL berada pada tingkat yang tinggi.

Pada suhu 10°C tidak terjadi aktivitas pertumbuhan pada seluruh isolat BAL karena kondisi lingkungan yang suhunya terlalu rendah sehingga isolat BAL sangat sulit untuk tumbuh. Pada suhu 45°C dan 55°C tidak terjadi aktivitas pertumbuhan pada seluruh isolat BAL karena kondisi lingkungan yang suhunya terlalu tinggi sehingga isolat BAL sangat sulit untuk tumbuh. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa seluruh isolat BAL tersebut tergolong ke dalam kelompok bakteri mesofilik (memiliki suhu optimum berkisar antara 20°C-37°C). Untuk pengamatan terhadap pertumbuhan dengan berbagai variasi pada pH, keempat isolat BAL ini menunjukkan hasil yang berbeda pula pada setiap nilai pH. Isolat BAL mampu tumbuh hanya pada nilai pH 4 dan 6, sementara pertumbuhan isolat BAL tidak terjadi pada nilai pH 8 dan 9,6. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa seluruh isolat BAL tersebut hanya dapat hidup pada lingkungan yang asam (aciduric). Untuk pengamatan terhadap pertumbuhan dengan berbagai variasi pada kadar garam, keempat isolat BAL ini menunjukkan hasil yang berbeda pula pada setiap nilai kadar garam. Isolat BAL mampu tumbuh hanya kadar garam 4%, 6,5% dan 10%, sementara pertumbuhan isolat BAL tidak terjadi pada nilai kadar garam 10% dan 15%. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa seluruh isolat BAL tersebut bukan merupakan bakteri yang mampu hidup pada lingkungan ekstrem dengan kadar garam yang tinggi (non-halofilik).

Identifikasi dengan menggunakan data karakter fenotipik dilakukan untuk menentukan kemungkinan genus dan spesies bakteri, dimana identifikasi ini dilakukan dengan metode profile matching yang mengacu pada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Berdasarkan identifikasi yang dilakukan dengan metode profile matching dan mengacu kepada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, dapat dikatakan bahwa keempat isolat BAL yang diperoleh tergolong ke dalam genus *Lactobacillus*. Dari metode *profile matching* yang telah dilakukan, keempat isolat (ES1B, ES1F, ES1G dan ES2D) dapat digolongkan ke dalam genus *Lactobacillus* karena memiliki banyak karakter yang serupa dengan jenis bakteri ini meliputi sel yang berbentuk batang (bacil), gram positif, tidak membentuk spora (*non spore-forming*), bersifat non-motil, katalase negatif, anaerob fakultatif dan mampu melangsungkan proses fermentasi dengan asam laktat sebagai produk akhirnya [20]. Adapun data karakter tiap isolat yang diperoleh pada penelitian kali ini dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Identifikasi isolat BAL ES1B dan ES1G dengan metode *profile matching* yang mengacu *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

Karakter	Isolat			Karakter Strain Pembanding I	
	ES1B	ES1G			
Morfologi	Koloni	Bentuk	<i>Circular</i>	Circular	<i>Circular</i>
		Warna	Putih kekuningan	Putih susu	Putih susu
		Elevasi	<i>Raised</i>	Raised	<i>Raised</i>
		Struktur dalam	<i>Translucent</i>	Translucent	<i>Translucent</i>
		Tepi	<i>Entire</i>	Entire	<i>Entire</i>
	Sel	Bentuk	Batang (<i>bacil</i>) yang tipis dan panjang	Batang (<i>bacil</i>) yang tipis dan panjang	Batang (<i>bacil</i>) yang tipis dan panjang
		Jenis gram	Gram Positif	Gram Positif	Gram Positif
		Produksi endospora	<i>Non spore-forming</i>	Non spore-forming	<i>Non spore-forming</i>
		Produksi indol	-	-	-
		Produksi H ₂ S	-	-	-
Biokimiawi	Fermentasi karbohidrat	Glukosa	HE	HE	HE
		Laktosa	HE	HE	HE
		Sukrosa	HE	HE	HE
		Galaktosa	HE	HE	HE
		Maltosa	HE	HE	HE
		Manitol	HE	HE	HE
		Xylosa	HE	HE	HE
		Fisiologis	Motilitas	Non-motil	Non-motil
Katalase	Katalase negatif		Katalase negatif	Katalase negatif	
Pertumbuhan BAL pada variasi suhu	10°C		-	-	-
	27°C		+++	+++	+++
	37°C		+++	+++	+++
	45°C		-	-	-
	55°C		-	-	-
Pertumbuhan BAL pada variasi pH	pH 4		+++	+++	+++
	pH 6		+++	+++	+++
	pH 8		-	-	-
	pH 9,6		-	-	-
Pertumbuhan BAL pada variasi kadar garam	4%		+++	+++	+++
	6,5%		+++	+++	+++
	10%		-	-	-
	15%		-	-	-
Hasil identifikasi	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>		

Keterangan:

- : Tidak memproduksi / tidak ada pertumbuhan
 +++ : Pertumbuhan banyak

HM : Homofermentatif
 HE : Heterofermentatif

Berdasarkan dari hasil identifikasi fentopik dengan menggunakan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, dapat diketahui bahwa isolat ES1B

dan ES1G teridentifikasi sebagai spesies *Lactobacillus fermentum*. Dapat diketahui pula bahwa isolat ES1F dan isolat ES2D teridentifikasi sebagai spesies *Lactobacillus plantarum*.

Tabel 2. Identifikasi isolat BAL ES1F dan ES2D dengan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

Karakter	Isolat			Karakter Strain Pembeding II	
	ES1F	ES2D			
Morfologi	Koloni	Bentuk	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>
		Warna	Putih susu	Putih kekuningan	Putih susu
		Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>
		Struktur dalam	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>
		Tepi	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>
	Sel	Bentuk	Batang (<i>bacil</i>) yang tebal dan pendek	Batang (<i>bacil</i>) yang tebal dan pendek	Batang (<i>bacil</i>) yang tebal dan pendek
		Jenis gram	Gram Positif	Gram Positif	Gram Positif
		Produksi endospora	<i>Non spore-forming</i>	<i>Non spore-forming</i>	<i>Non spore-forming</i>
		Produksi indol	-	-	-
		Produksi H ₂ S	-	-	-
Biokimiawi	Fermentasi karbohidrat	Glukosa	HE	HE	HE
		Laktosa	HE	HE	HE
		Sukrosa	HM	HE	HM
		Galaktosa	HE	HE	HE
		Maltosa	HM	HE	HM
		Manitol	HM	HM	HM
		Xylosa	HM	HM	HM
		Motilitas	Non-motil	Non-motil	Non-motil
Katalase	Katalase negatif	Katalase negatif	Katalase negatif		
Fisiologis	Pertumbuhan BAL pada variasi suhu	10°C	-	-	-
		27°C	+++	+++	+++
		37°C	+++	+++	+++
		45°C	-	-	-
		55°C	-	-	-
	Pertumbuhan BAL pada variasi pH	pH 4	+++	+++	+++
		pH 6	++	+++	+++
		pH 8	-	-	-
		pH 9,6	-	-	-
	Pertumbuhan BAL pada variasi kadar garam	4%	+++	+++	+++
		6,5%	+++	+++	+++
		10%	-	-	-
15%	-	-	-		
Hasil identifikasi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>		

Keterangan:

- : Tidak memproduksi / tidak ada pertumbuhan

+++ : Pertumbuhan banyak

HM : Homofermentatif

HE : Heterofermentatif

Aktivitas Antimikrobia Sel Bakteri Asam Laktat

Uji aktivitas antimikrobia bertujuan untuk mengetahui potensi sel kultur isolat BAL untuk menghasilkan senyawa antimikrobia. Tingkat potensi kultur sel isolat BAL dalam menghasilkan senyawa antimikrobia dapat dilihat dari besar zona penghambatan (zona halo) yang dihasilkan. Semakin besar ukuran zona penghambatan, maka semakin besar potensi yang dimiliki (Gambar 2). Zona jernih yang terbentuk dapat dibagi menjadi 2, yakni zona jernih dengan batas tepi jelas dan tegas

(menandakan adanya aktivitas bakteriosin) dan zona jernih dengan batas tepi kabur (menandakan adanya aktivitas asam) [21].

Pengujian aktivitas antimikrobia dengan metode *spot on the lawn* dipilih karena isolat BAL dapat tetap mampu memproduksi seluruh metabolit selama uji antimikrobia [13]. Pada pengujian ini, antibiotik kloramfenikol dipilih untuk menjadi kontrol positif karena memiliki spektrum hambatan luas, sehingga efektif menghambat pertumbuhan mikrobia patogen dan mengkonfirmasi sensitifitas bakteri patogen terhadap senyawa antimikrobia.

Medium NB tanpa kultur dipilih untuk menjadi kontrol negatif karena berfungsi mengkonfirmasi media NB tanpa adanya isolat BAL tidak memberikan efek penghambatan terhadap bakteri patogen uji [22]. Bakteri patogen uji yang digunakan pada pengujian kali ini adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.



Gambar 2. Aktivitas antimikrobia *Lactobacillus fermentum* ES1B dan ES1G serta *Lactobacillus plantarum* ES1F dan ES2D yang ditandai dengan zona jernih terhadap bakteri patogen (a) *Staphylococcus aureus* dan (b) *Escherichia coli*. Keterangan: A: ES1B, B: ES1F, C: ES1G, D; ES2D dan E: Kontrol +

Hasil aktivitas antibakteri dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*. Pengujian ini menunjukkan hasil berbeda pada tingkat kepercayaan 95% (signifikansi 0,05). Hal ini berarti jenis isolat BAL berpengaruh terhadap aktivitas antimikrobia untuk menghambat pertumbuhan kedua bakteri patogen uji. Adapun data yang diperoleh pada penelitian kali ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Zona penghambatan pada uji antimikrobia isolat BAL dari limbah produksi tempe terhadap bakteri patogen uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Zona hambat (mm)		
Isolat	<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolat
Kontrol -	0,0 ± 0,0^a	Kontrol -
<i>Lactobacillus fermentum</i> ES1B	14,00 ± 1,0 ^c	<i>Lactobacillus fermentum</i> ES1B
<i>Lactobacillus plantarum</i> ES1F	10,00 ± 1,0 ^b	<i>Lactobacillus plantarum</i> ES1F
<i>Lactobacillus fermentum</i> ES1G	14,33 ± 1,53^c	<i>Lactobacillus fermentum</i> ES1G
<i>Lactobacillus plantarum</i> ES2D	11,00 ± 1,0 ^b	<i>Lactobacillus plantarum</i> ES2D
Kontrol +	27,67 ± 1,53^d	Kontrol +

Aktivitas antimikrobia oleh isolat BAL yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogen dapat terjadi karena adanya aktivitas internal isolat yang menghasilkan asam maupun

komponen metabolit lainnya. Adanya akumulasi metabolit primer (seperti asam asetat, asam laktat, etanol, dan karbondioksida) serta produksi komponen antimikrobia lain (seperti H₂O₂, diasetil dan bakteriosin) memicu terjadinya aktivitas antimikrobia oleh isolat BAL [23]. Asam laktat menjadi komponen antimikrobia utama yang berperan penting dalam aktivitas penghambatan mikroba patogen oleh isolat BAL. Adapun genus *Lactobacillus* yang diperoleh pada penelitian kali ini termasuk ke dalam golongan fakultatif heterofermentatif dan heterofermentatif sehingga menghasilkan asam laktat dari proses fermentasi melalui jalur *Pentose-Phosphate Pathway (PPP)*. Tidak hanya asam laktat, pada proses fermentasi ini dimungkinkan untuk dihasilkan produk lain seperti CO₂, etanol, atau asetat [24].

Pada pengujian aktivitas antimikrobia kali ini, digunakan isolat bakteri patogen uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebagai indikator. Digunakannya dua jenis bakteri patogen uji dengan jenis gram yang berbeda bertujuan untuk melihat spektrum penghambatan dari isolat BAL yang diuji. Isolat BAL yang memiliki spektrum penghambatan yang luas (*wide-spectrum*) merupakan bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan baik bakteri patogen kelompok gram positif maupun gram negatif, sedangkan bakteri dengan spektrum penghambatan terbatas (*narrow-spectrum*) merupakan bakteri yang hanya mampu menghambat salah satunya [25]. Keempat isolat BAL yang diperoleh dari limbah produksi tempe telah dibuktikan mampu menghasilkan aktivitas penghambatan pada kedua jenis bakteri patogen tersebut. Daya hambat rata-rata seluruh isolat BAL terhadap bakteri *Escherichia coli* pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan demikian, seluruh isolat BAL yang diperoleh dari limbah produksi tempe merupakan bakteri dengan spektrum penghambatan yang luas (*wide-spectrum*).

Setiap isolat BAL diketahui memiliki luas zona penghambat yang berbeda-beda yang disebabkan oleh perbedaan kecepatan tumbuh dari isolat BAL serta kecepatan difusi dari senyawa antimikrobia yang dihasilkan [26]. Beberapa faktor seperti ukuran, jumlah serta bentuk zat yang berdifusi dapat mempengaruhi proses difusi yang terjadi. Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat diketahui bahwa aktivitas antimikrobia BAL memiliki nilai yang bervariasi dan seluruhnya berada pada tingkat yang lebih rendah dari antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif. Untuk menghambat pertumbuhan

dari bakteri *Staphylococcus aureus*, isolat ES1G memiliki rata-rata zona penghambatan yang paling tinggi sementara isolat ES1F memiliki rata-rata zona penghambatan yang paling rendah. Untuk menghambat pertumbuhan dari bakteri *Escherichia coli*, isolat ES1G memiliki rata-rata zona penghambatan yang paling tinggi sementara isolat ES2D memiliki rata-rata zona penghambatan yang paling rendah. Secara keseluruhan, rata-rata zona penghambatan yang tertinggi dimiliki oleh isolat ES1G dalam menghambat pertumbuhan dari bakteri *Escherichia coli* sementara rata-rata zona penghambatan yang terendah dimiliki oleh isolat ES1F dalam menghambat pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus*.

Simpulan

Berdasarkan hasil diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa seluruh isolat BAL yang diperoleh dari limbah produksi tempe (ES1B, ES1F, ES1G dan ES2D) masing-masing memiliki karakter morfologis, biokimiawi dan fisiologis yang dapat digunakan untuk melakukan identifikasi fenotipik hingga pada tingkat spesies dengan menggunakan metode *profile matching* yang mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Terdapat dua spesies BAL berbeda pada limbah produksi tempe, yakni *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus plantarum*. Seluruh isolat BAL diketahui pula memiliki spektrum penghambatan yang luas terhadap bakteri patogen uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sebagian besar isolat menunjukkan aktivitas penghambatan dengan tingkat yang rendah. Diameter zona hambat yang cukup besar ditunjukkan oleh isolat ES1B dan ES1G dengan aktivitas penghambatan tingkat sedang terhadap *Escherichia coli*, yakni masing masing sebesar $16,33 \pm 1,53$ dan $17,0 \pm 2,0$.

Pustaka

- [1] Sopandi T., Wardah (2014), *Mikrobiologi Pangan: Teori dan Praktik*, Penerbit ANDI, Yogyakarta.
- [2] Kumalaningsih S. (2016), *Rekayasa Komoditas Pengolahan Pangan*, UB Press, Malang.
- [3] Widowati, S. (2016), *Teknologi Pengolahan Kedelai*, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor.
- [4] Kulla P.D.K., Retnaningrum E. (2019), *Biochemical and Microbial Change in Food Fermentation 'Ubi Karet Busuk' Sumba, East Nusa Tenggara, Indonesia*, *ACM International Conference Proceeding Series*. 24-27.
- [5] Usman N.A., Suradi K., Gumilar J. (2018), Pengaruh konsentrasi bakteri asam laktat *Lactobacillus Plantarum* dan *Lactobacillus Casei* terhadap mutu mikrobiologi dan kimia mayones probiotik, *Jurnal Ilmu Ternak*. 18 (2), 79-85.
- [6] Ko S., Ahn C. (2000), Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA 2386 isolated from white kimchi, *Food Science and Biotechnology*. 9 (1), 263 - 269.
- [7] Oliveira M., Serrano I. (2015), *Frontiers in antimicrobial agents: The challenging of antibiotic resistance in the development of new therapeutics*, Bentham Ebooks, Lisbon.
- [8] Sun Z.H., Yu J., Dan T., Zhang W.Y., Zhang H.P. (2014), *Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria: Lactic Acid Bacteria-Fundamentals and Practice*, first ed., Springer Publishing Inc., New York.
- [9] Liu W., Pang H., Zhang H., Cai Y. (2014), *Biodiversity of lactic acid bacteria: Lactic Acid Bacteria-Fundamentals and*, first ed., Springer Publishing Inc., New York.
- [10] Adam M.R., Moss M.O. (2008), *Food Microbiology*, third ed., RSC Publishing, Cambridge.
- [11] Nurhikmayani R., Daryono, B.S., Retnaningrum E. (2019), Isolation and molecular identification of antimicrobial-producing Lactic Acid Bacteria from chao, South Sulawesi (Indonesia) fermented fish product, *Biodiversitas*. 20 (4), 1063-1068.
- [12] Retnaningrum E., Yossi T., Nur'azizah R., Sapalina F., Kulla P.D.K. (2020), Characterization of a bacteriocin as biopreservative synthesized by indigenous lactic acid bacteria from dadih soya traditional product used in West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*. 21 (9), 4192-4198.
- [13] Tremonte P., Pannella G., Succi M., Tripaldi L., Sturchio M., Coppola R., Luongo D., Sorrentino E. (2017), Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different environment : A Preliminary Study, *International Food Research Journal*. 24 (2), 852-859.
- [14] Post K., Songer G.J. (2005), *Microbiology bacterial and fungal agent of animal disease*, Elsevier Saunders, Philadelphia.

- [15] Prescott L.M., John P.H. (2002), *Microbiology*, fifth ed., McGraw-Hill Company, New York.
- [16] Laboffe M.J., Pierce B.E. (2019), *Microbiology laboratory theory & application essentials*, Morton Publishing Company, Englewood.
- [17] Delost M.D. (2015), *Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences*, Jones & Bartlett Learning, USA.
- [18] Murwani S. (2015), *Dasar-Dasar Mikrobiologi Veteriner*, UB Press, Malang.
- [19] Lestari L.A., Harmayani E., Utami T., Sari P.M., Nurviani S. (2018), *Dasar-Dasar mikrobiologi makanan di bidang gizi dan kesehatan*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- [20] de Vos P. D., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, second ed., vol 3, *The Firmicutes*, Springer, New York.
- [21] Romadhon, Hamidah M., Rianingsih L. (2019), Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*. 1 (2), 11-21.
- [22] Cardici B.H., Citak S. (2005), A comparison of two methods used for measuring antagonistics activity of lactic acid bacteria, *Pakistan Journal of Nutrition*. 4 (4), 237-241.
- [23] Delgado A., Brito D., Fevereiro P., Peres C., Marques J.F. (2001), Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional Lactic acid fermentation of table olives, *INRA, EDP Science*. 81 (1), 203-215.
- [24] Shah N.P. (2000), Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods, *Journal of Dairy Science*. 83 (4), 894-907.
- [25] Mycek M.J., Richard A.H., Pamela C. (1997), *Farmakologi: Ulasan Bergambar*, Penerbit Widya Medika, Jakarta.
- [26] Davidson P.M., Parish M.E. (1989), Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, *Food Technology*. 1, 148-155.