

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA DARI BUAH KERSEN (*Muntingia calabura* L.)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCER LACTIC ACID BACTERIA FROM KERSEN FRUIT (*Muntingia calabura* L.)

Divya Chika Giyatno, Endah Retnaningrum*

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

*email korespondensi: endahr@ugm.ac.id

Abstrak

Bakteri asam laktat (BAL) dapat memberikan manfaat dan aman untuk dikonsumsi manusia. Bakteri ini menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi menghasilkan eksopolisakarida (EPS). Bakteri asam laktat ditemukan pada buah-buahan salah satunya buah kersen (*Muntingia calabura* L.). Kandungan karbohidrat yang tinggi dalam buah ini cocok untuk pertumbuhan BAL. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri asam laktat beserta karakter fenotipik dan mengetahui potensinya dalam menghasilkan eksopolisakarida. Isolat bakteri asam laktat diperoleh dengan cara inokulasi suspensi buah kersen ke dalam medium MRS (de Man Rogosa Sharpe). Isolat bakteri asam laktat yang diperoleh kemudian dikarakterisasi fenotipik berdasarkan morfologi koloni, sel, sifat biokimiawi, dan fisiologis. Sebanyak empat isolat BAL diperoleh dengan bentuk sel basil, gram positif, katalase negatif, non-motil, non spore forming, mesofilik, acidurik, non halofilik serta dapat memfermentasi karbohidrat. Berdasarkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology keempat isolat teridentifikasi sebagai spesies *Lactobacillus plantarum*. Keempat isoalat juga menunjukkan kemampuan menghasilkan eksopolisakarida dengan kisaran 870-1.910 mg/L.

Kata kunci: Eksopolisakarida, *Lactobacillus plantarum*, Metabolit Sekunder, *Muntingia calabura* L.

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) can provide benefits and are safe for human consumption. These bacteria produce secondary metabolites that have the potential to produce exopolysaccharides (EPS). Lactic acid bacteria are found in fruits, one of which is kersen fruit (Muntingia calabura L.). The high carbohydrate content in this fruit is suitable for the growth of LAB. This study aims to determine the presence of lactic acid bacteria and their phenotypic characters and to determine their potential in producing exopolysaccharides. Lactic acid bacteria isolates were obtained by inoculating the kersen fruit suspension into MRS medium (de Man Rogosa Sharpe). The isolates of lactic acid bacteria obtained were then phenotypically characterized based on colony morphology, cells, biochemical, and physiological properties. A total of four LAB isolates were obtained in the form of bacillus cells, gram positive, catalase negative, non-motile, non-spore forming, mesophilic, aciduric, non-halophilic and can ferment carbohydrates. Based on Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the four isolates were identified as species of Lactobacillus plantarum. The four isoalates also showed the ability to produce exopolysaccharides in the range of 870-1.910 mg /L.

Keywords: Exopolysaccharides, *Lactobacillus plantarum*, *Muntingia calabura* L, Secondary Metabolites.

Pendahuluan

Tanaman kersen (*Muntingia calabura* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan, untuk mencegah penyakit dan meningkatkan sistem imun. Buah kersen merupakan salah satu buah-buahan yang kaya akan sumber vitamin, mineral dan senyawa lainnya yang dapat memberikan efek positif bagi kesehatan tubuh. Pemanfaatan buah kersen yang telah masak belum banyak diketahui oleh masyarakat khususnya di Indonesia padahal buah kersen dapat dimanfaatkan dengan maksimal karena keberadaannya yang melimpah dan dapat tumbuh dimana saja. Tanaman kersen baru-baru ini

mendapatkan status sebagai tanaman obat dan memiliki potensi besar untuk digunakan dalam industri makanan dan industri farmasi [1].

Buah kersen memiliki potensi sebagai prebiotik dan probiotik serta memiliki senyawa antibakteri bagi tubuh untuk mencegah penyakit saluran pencernaan yang diakibatkan oleh bakteri patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebagai penyebab infeksi saluran pencernaan. Berbagai jenis mikroorganisme hidup di saluran pencernaan manusia, salah satunya adalah bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat termasuk ke dalam jenis bakteri baik yang

terdapat dalam makanan dan minuman sehat. Bakteri asam laktat juga berkontribusi dalam menghambat pembusukan makanan dan mikroorganisme patogen. Bakteri asam laktat telah teridentifikasi dari beberapa makanan fermentasi Indonesia seperti pada genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus* [2, 3, 4].

Beberapa kelompok BAL menghasilkan metabolit sekunder yaitu eksopolisakarida (EPS) atau *Extracellular polysaccharide*. Polimer ini disekresikan oleh bakteri ke luar selnya saat mengalami kondisi tidak menguntungkan. Kondisi yang diakibatkan oleh cekaman lingkungan tersebut membuat sel bakteri membentuk perlindungan diri dengan cara mensekresikan eksopolisakarida. Selain itu EPS juga berperan untuk memberikan perlindungan pada sel bakteri terhadap bakteriofag, fagositosis, stres osmotik, senyawa beracun dan berperan dalam pembentukan biofilm. Dalam industri makanan, polimer ini berperan dalam meningkatkan tekstur produk, pengemulsi atau pembentukan gel, penstabil, viskositas dan rasa [5]. Dalam saluran pencernaan eksopolisakarida akan menempel pada mukosa usus, sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen melalui induksi molekul *immunomodulator* dan memberikan efek antagonis terhadap bakteri patogen oleh asam laktat [6].

Saat ini penelitian tentang kemampuan BAL menghasilkan eksopolisakarida telah banyak dilakukan terutama produk berbasis fermentasi susu. Namun belum banyak diketahui potensi eksopolisakarida yang dihasilkan BAL pada produk berbasis buah-buahan seperti buah kersen ini. Oleh karena itu penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui adanya keberadaan BAL dan bagaimana karakter fenotipik BAL yang diisolasi dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.) serta mengetahui potensinya dalam menghasilkan eksopolisakarida.

Metode Penelitian

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat diisolasi dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.) masak ditimbang sebanyak 5 g dan dihaluskan menggunakan mortar. Setelah itu dilakukan pengenceran hingga 10^{-5} pada tabung reaksi yang berisi 9 mL pepton water steril kemudian di homogenkan menggunakan *vortex shaker*. Tiga seri pengenceran (10^{-3} - 10^{-5}) masing-masing diambil sebanyak 1 mL diinokulasikan secara *pour plate* pada medium MRS Agar yang telah disuplementasi dengan CaCO_3 1% (b/v).

Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-72 jam. Isolat yang menghasilkan zona jernih kemudian di purifikasi untuk mendapatkan isolat murni. Purifikasi dilakukan dengan teknik *streak plate* empat kuadran. Selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis.

Karakterisasi Fenotipik Bakteri Asam Laktat (BAL) Karakterisasi Morfologis

Pengamatan secara makroskopis (dilihat secara langsung) berupa morfologi koloni yang terlihat. Parameter yang diamati yaitu warna, bentuk, elevasi, tepi, dan struktur dalam koloni. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis dilakukan menggunakan mikroskop untuk melihat bentuk, susunan, warna, ada tidaknya endospora dari sel bakteri. Pengamatan morfologi sel dilakukan pengecatan gram untuk membedakan golongan bakteri gram positif (ungu) dengan bakteri gram negatif (merah). Pengecatan dilakukan pada kultur bakteri berumur 24 jam yang ditumbuhkan pada medium MRS Agar miring. Pengecatan terdiri dari cat gram A (Kristal violet), gram B (Larutan lugol), gram C (Alkohol), dan gram D (Safranin). Hasil pengecatan diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x. Pengecatan gram tersebut dapat melihat bentuk, susunan, warna, dan ada tidaknya endospora. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif sehingga hasil pengecatan gram menghasilkan warna ungu.

Pada pengecatan endospora menggunakan cat utama yaitu *Malachite green* 5% dan safranin. Isolat bakteri digoreskan pada permukaan gelas benda menggunakan jarum ose, setelah itu diteteskan 1-2 tetes *Malachite green* kemudian di fiksasi. Selanjutnya diteteskan 1-2 tetes safranin dan dikering anginkan. Hasil yang diperoleh diberi minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x. Hasil positif berupa adanya spora berwarna hijau. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang tidak menghasilkan endospora.

Karakterisasi Biokimiawi

Uji produksi Indol dan H_2S

Pada pengujian indol dan H_2S tiap isolat BAL diinokulasikan secara tusukan ke dalam medium semi solid yaitu *Sulfide Indole Motility* (SIM) dan diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi medium diteteskan sebanyak 3 tetes reagen *Ehrlich* ke atas permukaan secara aseptis. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin indol berwarna merah. Terdapat endapan berwarna hitam pada medium menandakan bakteri yang diinokulasi dapat memproduksi H_2S .

Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menginokulasi isolat BAL pada medium *Nutrient Broth* (NB) yang ditambahkan sumber karbon tertentu dan diberi indikator *phenol red*. Sumber karbon yang digunakan adalah sukrosa, glukosa, laktosa, maltosa, galaktosa, manitol, dan xylosa. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna medium dari merah menjadi orange atau kuning.

Karakterisasi Fisiologis

Uji Katalase

Hidrogen peroksida (H_2O_2) 30% diteteskan 1-2 tetes pada isolat BAL berumur 24 jam yang telah diletakkan diatas gelas benda menggunakan jarum ose. Uji katalase positif apabila terbentuk gelembung setelah ditambahkan hidrogen peroksida. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase.

Uji Motilitas

Untuk mengamati motilitas dari bakteri asam laktat, tiap isolat diinokulasikan secara tusukan ke dalam medium semi solid *Sulfide Indole Motility* (SIM) dan diinkubasi selama 24-48 jam. apabila bakteri bersifat motil maka ditandai dengan menyebarnya pertumbuhan bakteri pada medium SIM (keluar dari area tusukan). Apabila bakteri bersifat non-motil maka ditandai dengan pertumbuhan bakteri hanya pada area bekas tusukan saja. Uji motilitas ini bertujuan untuk melihat pergerakan pertumbuhan dari bakteri.

Suhu

Untuk melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan digunakan medium *MRS Broth* yang telah terlebih dahulu diinokulasikan isolat BAL. Kemudian diinkubasi dengan suhu yang bervariasi yaitu 10°C, 25°C, 37°C, 45°C, dan 55°C selama 24-48 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan medium menjadi lebih keruh.

pH

Untuk melihat pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri, isolat BAL yang sudah diinokulasikan pada medium *MRS Broth* dengan variasi pH 5, 6, 9, dan 10 setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan medium menjadi keruh

Kadar Garam

Pengaruh pemberian konsentrasi kadar garam terhadap pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari Isolat BAL yang diinkubasi selama 24-48 jam pada

media MRSB dengan variasi kadar NaCl 6,5% dan 18%. Hasil keruh menandakan isolat tersebut dapat tumbuh pada medium yang diberi NaCl tersebut.

Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Hasil karakterisasi fenotipik bakteri asam laktat kemudian ditentukan genus dan spesiesnya dengan cara membandingkan karakter menggunakan metode *profile matching* berdasarkan buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Uji Eksopolisakarida Kasar

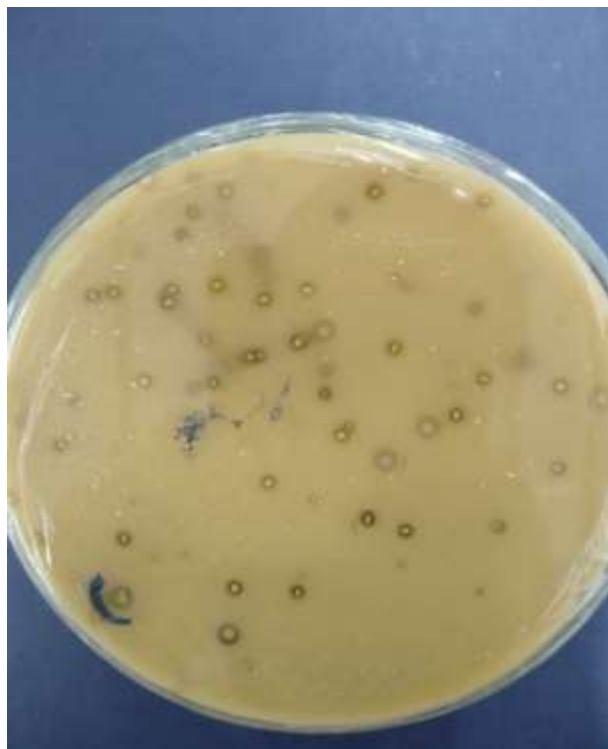
Pada pengujian eksopolisakarida kasar dilakukan dengan metode gravimetri. Isolat BAL ditumbuhkan pada medium MRSB sebanyak 30 mL. Pemisahan sel bakteri dilakukan melalui proses sentrifugasi dengan suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm selama 45 menit. Supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan alkohol 96% sebanyak 2x volume sampel dan disimpan pada suhu dingin selama semalaman. Kemudian dilakukan pemisahan kembali dengan sentrifugasi selama 45 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Pellet yang didapatkan kemudian keringkan dan ditimbang berat kering hingga konstan [7].

Hasil dan Diskusi

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Pada penelitian ini, menggunakan buah kersen (*Muntingia calabura* L.) sebagai sampel yang diisolasi. Buah ini diperoleh dari pohon yang tumbuh pada daerah sekitar Universitas Gadjah Mada, Sleman, Yogyakarta. Buah yang dijadikan sampel yaitu buah yang sudah masak, berwarna merah, dan memiliki aroma manis. Buah ini telah berkontribusi terhadap asupan karbohidrat (14,64 %), protein (2,64 %), lipid (2,34 %), serat (1,75 %), dan mineral (1,28 %). Selain itu, mengandung senyawa fenolik terlarut dan flavonoid. Kandungan antioksidan yang tinggi dari buah ini memiliki potensi untuk digunakan dalam industri pangan [8].

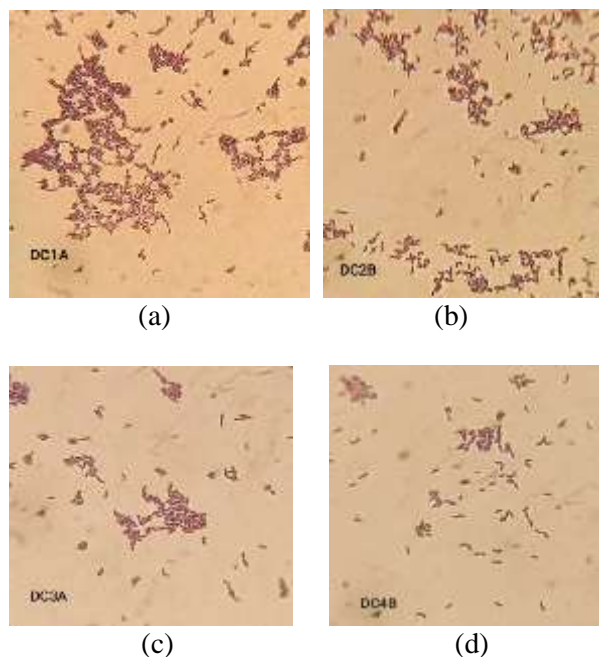
Berdasarkan penelitian ini didapatkan bakteri asam laktat sejumlah empat isolat dari hasil isolasi dan purifikasi yang telah dilakukan ditandai dengan adanya zona jernih pada medium *MRS Agar-CaCO3* 1%. Proses fermentasi pada buah kersen (*Muntingia calabura* L.) terjadi fermentasi secara alami dengan bantuan mikroflora indigenous tanpa adanya penambahan mikrobial dari luar (kultur stater) untuk proses fermentasinya. Kandungan karbohidrat yang tinggi dalam buah kersen sangat cocok untuk pertumbuhan bakteri asam laktat.



Gambar 1. Pertumbuhan koloni BAL yang ditunjukkan dengan terdapatnya zona jernih disekitar koloni.

Identifikasi Bakteri Asam Laktat

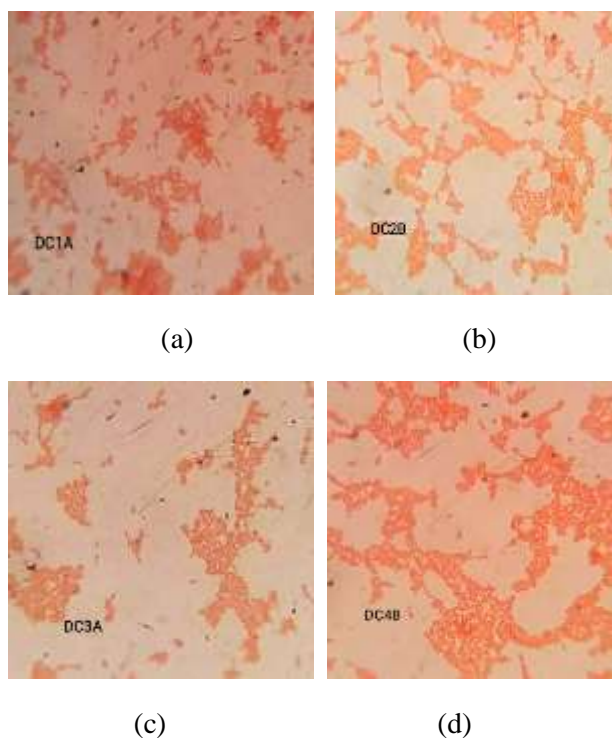
Identifikasi merupakan salah satu langkah penting untuk menentukan kelompok dari suatu bakteri yang didapatkan dari proses isolasi. Proses identifikasi bisa dilakukan dengan metode *profile matching* dengan melihat karakter fenotipik isolat BAL yang diperoleh dengan karakter kunci. Karakter kunci terdapat pada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* sebagai acuan dalam seleksi isolat bakteri asam laktat. Karakteristik utama bakteri asam laktat adalah tidak berspora, non-motil, gram positif, katalase negatif [9]. Susunan sel, bentuk sel, sifat biokimia, sifat fisiologis, dan karakteristik koloni dapat digunakan sebagai karakter pembeda dalam identifikasi tingkat genus dan spesies. Berdasarkan hasil identifikasi isolat DC1A, DC2B, DC3A, dan DC4B memiliki bentuk sel batang (*basil*). Sifat gram positif yang ditandai dengan terpulasnya warna ungu pada sel bakteri karena bakteri gram positif dinding selnya terdiri dari peptidoglikan yang lebih tebal dari bakteri gram negatif. Pada bakteri gram negatif hasil pengecatan gram akan menghasilkan warna merah pada sel bakteri.



Gambar 2. Pengecatan gram pada isolat bakteri asam laktat dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.) perbesaran 1000x. (a) isolat BAL DC1A, (b) isolat BAL DC2B, (c) isolat BAL DC3A, (d) isolat BAL DC4B. Seluruh isolat selnya berbentuk batang (*basil*) dan sel bakteri berwarna ungu.

Pada pengecatan endospora hasil yang didapatkan menunjukkan tidak terbentuknya spora (*non-spore forming*) berwarna hijau pada keempat isolat BAL dari buah kersen yang teramati dibawah mikroskop. Sel bakteri hanya terpulas warna merah karena cat safranin yang mampu melekat pada sel vegetatif dari bakteri. Pewarna utama dalam pengecatan endospora adalah *Malachite green* yang menentukan ada atau tidaknya spora pada bakteri. Pewarnaan ini penting dilakukan untuk mengetahui genus dan spesies dari bakteri.

Hasil uji katalase negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung yang menandakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari buah kersen tidak menghasilkan enzim katalase sehingga tidak terjadi penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi H_2O dan O_2 [10]. Keempat isolat bersifat *aciduric* karena mampu tumbuh pada pH 5 dan 6. Bakteri tumbuh pada pH asam menunjukkan bakteri asam laktat berpotensi sebagai probiotik. Bakteri probiotik memiliki kemampuan hidup dengan pH yang rendah sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen di saluran pencernaan [11]. Pada pengujian garam dengan konsentrasi 6,5% dan 18% menunjukkan isolat bakteri asam laktat yang diperoleh mampu tumbuh pada kadar garam 6,5% dan tidak dapat tumbuh pada lingkungan berkadar garam 18%. Ini menunjukkan keempat isolat bakteri *non-halophilic*.



Gambar 3. Pengecatan endospora pada isolat bakteri asam laktat dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.) perbesaran 1000x. (a) isolat BAL DC1A, (b) isolat BAL DC2B, (c) isolat BAL DC3A, (d) isolat BAL DC4B. Seluruh isolat selnya berbentuk batang, sel bakteri berwarna merah dan tidak terdapat endospora.

Salah satu faktor penting dalam kelangsungan hidup dan pertumbuhan bakteri yaitu kondisi suhu pertumbuhannya. Pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan dengan variasi suhu 10°C, 25°C, 37°C, 45°C, dan 55°C. Isolat BAL yang diperoleh merupakan tergolong bakteri mesofilik karena mampu tumbuh pada suhu optimum yaitu 25°C-37°C sedangkan pada suhu 45°C dan 55°C tidak terlihat pertumbuhan bakteri. pada suhu 10°C terdapat satu isolat yang mampu tumbuh. Hal ini menunjukkan setiap isolat memiliki kemampuan beradaptasi pada suhu berbeda-beda. Pada pengamatan karakteristik morfologi koloni pada tabel 1. keempat isolat memiliki bentuk koloni *circular*, bertepi *Entire*, memiliki struktur dalam *Opaque*, elevasi *convex*, koloni berwarna putih kekuningan, dan berukuran kecil.

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri asam laktat dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.)

Karakter Morfologi Koloni	Nama Isolat			
	DC1A	DC2B	DC3A	DC4B
1. Warna	Krem	Krem	Krem	Krem
2. Bentuk	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>	<i>circular</i>
3. Tepi	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>
4. Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>
5. Struktur Dalam	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>
6. Ukuran	Kecil	Kecil	Kecil	Kecil

Pengujian sifat biokimia dilakukan dengan pengujian kemampuan isolat BAL dalam memfermentasi sumber karbon tertentu. Pengujian dilakukan dengan medium *Nutrient Broth* (NB) yang ditambahkan sumber karbon dan *phenol red*. Keempat isolat mampu memfermentasi sukrosa, maltosa, xylosa, galaktosa, glukosa, laktosa, dan manitol yang ditandai dengan perubahan warna medium dari merah menjadi kuning. Keempat isolat BAL yang telah diisolasi tidak dapat memproduksi indol dan H₂S yang ditandai dengan tidak terbentuknya cincin indol berwarna merah dan tidak terbentuk endapan hitam pada medium *Sulfide Indole Motility* (SIM). Pengujian motilitas bakteri bisa dilakukan menggunakan medium SIM dengan melihat pergerakannya. Hasil menunjukkan keempat isolat bersifat non-motil yang ditandai dengan pertumbuhan dan persebaran bakteri di area bekas tusukan.

Berdasarkan karakteristik tersebut menunjukkan bakteri yang diisolasi teridentifikasi ke dalam genus *Lactobacillus* dengan spesies *Lactobacillus plantarum* berdasarkan karakter kunci pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [12]. Hasil Identifikasi dari isolat BAL buah kersen dapat dilihat pada tabel 2. Identifikasi dilakukan metode profile matching dengan cara mencocokkan karakter yang didapatkan dengan karakter kunci yang terdapat pada buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. *L. plantarum* tergolong bakteri yang memiliki status GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Bakteri ini memiliki banyak fungsi dan dapat hidup hampir di semua kondisi lingkungan. Bakteri ini banyak digunakan sebagai kultur starter pada berbagai makanan fermentasi, buah-buahan, daging, sayuran, produk sereal, ikan, dan susu [13].

Tabel 2. Karakter fenotipik isolat BAL dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.)

Karakteristik	Nama Isolat				<i>Lactobacillus plantarum</i> *
	DC1A	DC2B	DC3A	DC4B	
Morfologi sel					
Bentuk	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>
Sifat Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Endospora	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Fermentasi Karbohidrat					
Glukosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Xylosa	+	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+
Sifat Biokimiawi					
Produksi H ₂ S	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Produksi Indol	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Sifat Fisiologis					
Motilitas	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil
Katalase	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Suhu 10°C	√	-	-	-	√
Suhu 25°C	√	√	√	√	√
Suhu 37°C	√	√	√	√	√
Suhu 45°C	-	-	-	-	-
Suhu 55°C	-	-	-	-	-
pH 5	√	√	√	√	√
pH 6	√	√	√	√	√
pH 9	-	-	-	-	-
pH 10	-	-	-	-	-
Kadar NaCl 6,5%	√	√	√	√	√
Kadar NaCl 18%	-	-	-	-	-

Keterangan: *Karakteristik Morfologi *Lactobacillus plantarum* berdasarkan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [10]. (√): Tumbuh, (-): Tidak Tumbuh, (+): Dapat Memfermentasi Karbohidrat.

Produksi Eksopolisakarida

Pada penelitian ini dilakukan pengujian eksopolisakarida (EPS) yang dihasilkan dari tiap isolat BAL yang diperoleh pada tahap isolasi. Bakteri asam laktat menghasilkan produk metabolit sekunder berupa eksopolisakarida yang di sekresikan ke luar sel saat dalam kondisi yang tidak menguntungkan. EPS cenderung dipengaruhi oleh lingkungan bakteri seperti pH, fase pertumbuhan, ketersediaan nutrisi seperti sumber karbon dan nitrogen, suhu, dan kondisi fermentasi [14]. Pada pengujian ini menggunakan medium *MRS Broth* sebagai media tumbuh dari bakteri asam laktat karena pada media ini mengandung banyak nutrient yang disukai oleh BAL. Pada pengujian ini menggunakan isolat BAL umur 24 jam.

Digunakannya isolat umur 24 jam karena fase logaritmik berakhir pada waktu tersebut dan akan

memasuki fase stasioner dimana pada fase ini bakteri memproduksi EPS secara maksimal. Bakteri mulai mengalami kondisi ekstrim seperti berkurangnya nutrisi pertumbuhan sehingga menghasilkan produk metabolit sekunder berupa eksopolisakarida yang dikeluarkan ke luar sel saat kondisi tidak menguntungkan. Prinsip pengujian ini yaitu melakukan pemisahan eksopolisakarida dari sel bakteri menggunakan sentrifugasi suhu 4°C dengan tujuan mencegah denaturasi protein. Pellet yang didapatkan dari hasil proses tersebut di keringkan dan di timbang hingga mencapai berat konstan. Hasil yang didapat kemudian dianalisis secara kuantitatif.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan keempat isolat BAL dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.) mempunyai kemampuan memproduksi eksopolisakarida yang beragam

jumlahnya, yaitu berkisar 870-1.910 mg/L. Rata-rata produksi EPS tertinggi pada spesies *Lactobacillus Plantarum* DC4B dengan nilai EPS sebesar $1.910 \pm 164,62$ mg/L. Produksi terendah yaitu spesies *L. Plantarum* DC1A yaitu $870 \pm 20,00$ mg/L. Sedangkan *L. plantarum* DC2B dan *L. plantarum* DC3A nilai eksopolisakaridanya tidak jauh berbeda yaitu $1417 \pm 45,09$ mg/L dan $1456 \pm 25,16$ mg/L.

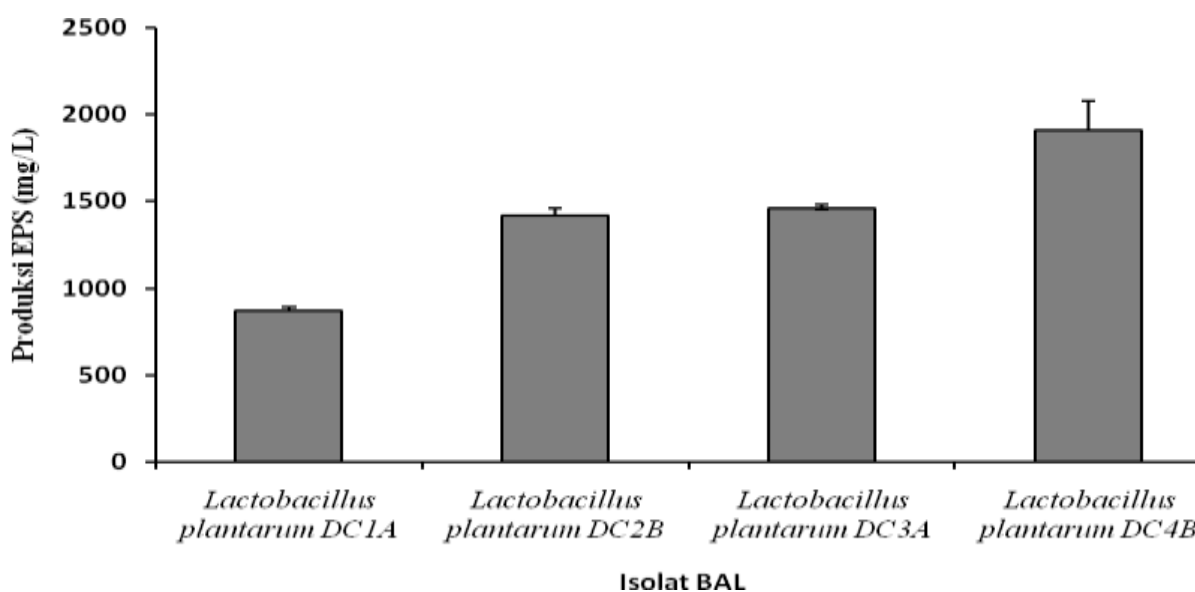
Pada spesies yang sama didapatkan hasil eksopolisakarida yang berbeda disebabkan perbedaan strain bakteri akibat adanya keanekaragaman genetik pada bakteri yang diisolasi dari buah kersen. Perbedaan strain ini menandakan bahwa gen yang terdapat pada keempat isolat BAL ini juga berbeda, setiap gen memiliki fungsi dan kemampuan yang berbeda sehingga mengakibatkan perbedaan proses metabolisme dan perbedaan hasil metabolit yang diproduksinya [15]. Eksopolisakarida yang diproduksi oleh mikrobia berpotensi besar untuk masa depan, pemanfaatan mikrobia untuk memproduksi polisakarida sangat menguntungkan dari segi ekonomi dibanding polisakarida tanaman. Dalam memproduksi polisakarida mikrobia bisa dilakukan terus menerus dalam skala besar dan tidak membutuhkan lahan yang luas seperti tanaman. [16].

Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat bakteri asam laktat pada buah kersen (*Muntingia calabura* L.) yang memiliki karakter fenotipik yaitu bentuk koloni *circular*, bertepi *Entire*, memiliki struktur dalam *Opaque*, elevasi *convex*, koloni berwarna putih kekuningan, dan berukuran kecil. Bentuk sel batang, gram positif, katalase negatif, non-motil, *non spore forming*, tidak menghasilkan cincin indol dan H₂S, mesofilik, non-halofilik, tumbuh pada pH antara 5-6, dan dapat memfermentasi glukosa, maltosa, galaktosa, laktosa, manitol, xylosa, serta sukrosa. Hasil karakterisasi tersebut menunjukkan bahwa keempat isolat BAL merupakan genus *Lactobacillus* dengan spesies *Lactobacillus plantarum*. Hasil eksopolisakarida isolat DC1A, DC2B, DC3A, DC4B diketahui bahwa isolat BAL tersebut mampu memproduksi eksopolisakarida sebesar 870-1.910 mg/L.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Sumarno, S.Si., M.Sc. selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan penulis ide, dukungan, diskusi penalaran yang membina dan menjadi semangat untuk menyusun penelitian ini.



Gambar 4. Produksi eksopolisakarida kasar keempat isolat bakteri asam laktat dari buah kersen (*Muntingia calabura* L.).

Pustaka

- [1] Mahmood N. D., Nasir N. L. M., Rofiee, M. S., Tohid S. F. M., Ching S. M., Teh L. K., Salleh M. Z., Zakaria, Z. A. (2014). *Muntingia calabura*: A review of its traditional uses, chemical properties, and pharmacological observations, *Pharmaceutical Biology*. 52, 1598-1610.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4]. 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.
- [5] Zubaidah E., Liasari Y., Saparianti E. (2008), Production of exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* B2 in mulberry based probiotic product, *Jurnal Teknologi Pertanian*. 9, 59-68.
- [6] Davari D.D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S. J., Berenjian A., Younes G. (2019), Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications, *Foods*. 8, 1-16.
- [7] Halim C.N., Zubaidah E. (2013), Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*), *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 1, 129-137.
- [8] Pereira G. A., Arruda H. S., de Morais D. R., Eberlin M. N., Pastore G. M. (2018), Carbohydrates, volatile and phenolic compounds composition, and antioxidant activity of calabura (*Muntingia calabura* L.) fruit, *Food Research International*. 108, 264–273.
- [9] Axelsson L., *Lactic Acid Bacteria: Classification And Physiology*, in : Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A. (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects*, 3rd Edition. Marcel Dekker Inc, New York, 2004, pp. 245-330.
- [10] Taylor W. I., Achanzar D. (1972), Catalase Test as an Aid to the Identification of *Enterobacteriaceae*, *Applied Microbiology*. 24, 58-61.
- [11] Karthikeyan V., Santosh S.W. (2009), Isolation and Partial Characterization of Bacteriocin Produced from *Lactobacillus plantarum*, *African Journal of Microbiology Research*. 3, 233-239.
- [12] Whitman W. B. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second ed., Springer-Verlag, New York.
- [13] Todorov S. D., Franco B. D. G. D. M. (2010). *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the species and application in food production, *Food Reviews International*. 26, 205–229.
- [14] Petry S., Furlan S., Crepeau M. J., Cerning J., Desmazeaud M. (2000), Factors affecting exocellular polysaccharide production By *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* grown in a chemically defined medium, *Appl and Environment Microbiol*. 66, 3427-3431.
- [15] Pham P.L., Dupont I., Roy D., Lapointe G., Cerning J. (2000), Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation, *Appl Environ Microbiol*. 66, 2302-2310.
- [16] Malaka R., Metusalach., Abustam E. (2007), Pengaruh jenis mineral terhadap produksi eksopolisakarida dan karakteristik pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* Strain Ropy Dalam Media Susu, *Jurnal Peternakan*. 2, 111-122.