

Identification Lactic Acid Bacteria Potentially as Probiotic at Joruk Maman

Mulyani, S
Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes Riau
sri.mulyani@pkr.ac.id

Article Info

Article history

Received date: 2019-12-04

Revised date: 2019-12-27

Accepted date: 2019-12-31

Abstract

Consumer trends for food have developed with increasing health awareness likes demand for probiotics has begun to increase. Indonesian food potentially as sources of lactic acid bacteria that function as probiotic. Joruk Maman is a fermented food of Riau Province. Joruk Maman has been known to contain lactic acid bacteria (LAB). The functional properties of LAB as probiotics can differ depending on the strain. The research objective is to identify and characterize lactic acid bacteria from Joruk Maman. LAB characteristics include gram properties, shape, motility, catalase properties and testing for resistance to gastric and intestinal pH conditions and identification with API Test Kits. The results showed that lactic acid bacterial isolates from Joruk Maman were rod-shaped, gram-positive, non-motile, catalase negative. LAB Joruk Maman potentially as a probiotic candidate that is 93.07% resistant to gastric conditions (pH 2.0) and 96.13% to intestinal conditions (pH 7.2) and identified as *Weissella confusa*

Keywords:

Joruk Maman; probiotic; *Weissella confusa*

Abstrak

Tren konsumen pangan telah mengalami perkembangan dengan meningkatnya kesadaran akan kesehatan, seperti permintaan probiotik yang mulai meningkat. Indonesia kaya akan sumber bakteri asam laktat yang berpotensi probiotik. Joruk Maman merupakan makanan fermentasi khas Propinsi Riau. Joruk Maman telah diketahui mengandung bakteri asam laktat. Sifat fungsional dari BAL probiotik dapat berbeda tergantung strainnya. Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari Joruk Maman. Karakterisasi BAL meliputi sifat gram, bentuk, motilitas, sifat katalase dan pengujian ketahanan terhadap kondisi pH lambung dan usus serta identifikasi dengan API Kit Tes. Hasil Penelitian menunjukkan isolat bakteri asam laktat dari Joruk Maman berbentuk batang, bakteri gram positif, bersifat katalase negatif dan non motil. BAL Joruk Maman berpotensi sebagai kandidat probiotik yaitu tahan terhadap pH lambung (2.0) dan usus (7.2) dengan ketahanan 93.07 % pada pH lambung dan 96.13 % pada pH usus serta teridentifikasi sebagai *Weissella confusa*.

Kata Kunci

Joruk Maman; probiotik; *Weissella confusa*

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang bersifat gram positif yang dikenal juga sebagai mikroorganisme yang aman atau Generally Recognized as Safe (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan, bahkan beberapa jenis bakteri tersebut bermanfaat bagi kesehatan [1]. BAL mampu hidup pada berbagai habitat yang cukup luas di alam seperti pada tanaman, pada saluran pencernaan baik hewan maupun manusia, juga pada berbagai

produk makanan fermentasi seperti: yogurt, minuman dan makanan fermentasi, keju, dll. Sifat terpenting dari BAL adalah kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat [2]. Menurut Candra et al (2007) [3], BAL yang berkembang dalam produk fermentasi mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang bersifat patogen. BAL juga memiliki sifat fungsional yaitu sebagai probiotik. Collado et al. (2007) [4] melaporkan bahwa probiotik yang umumnya digunakan pada produk pangan

terutama (BAL) galur *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dan beberapa dari *Propionibacterium*. FAO/WHO (2006) [5] mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya. Kesadaran konsumen akan pangan fungsional dan fakta probiotik yang dapat memberikan manfaat terhadap kesehatan menyebabkan peningkatan permintaan konsumen terhadap makanan yang mengandung probiotik di seluruh dunia [6][7].

Joruk Maman merupakan makanan khas di Propinsi Riau, khususnya di Kecamatan Tanah Putih Kabupaten Rokan Hilir. Joruk Maman dibuat dari daun dan batang muda tanaman Maman (*Cleome gynandra* L) yang difermentasi secara alami dengan menambahkan garam, nasi putih dan air hangat, kemudian dibiarkan sekama 2 – 3 hari sebelum dikonsumsi. Fermentasi Maman atau Joruk Maman ini merupakan produk makanan yang telah diketahui mengandung bakteri asam laktat yang berfungsi sebagai probiotik. Muharni et al (2016) [8] melaporkan kandungan bakteri asam laktat pada fermentasi Maman dengan perlakuan penambahan garam 5% dan nasi 10% memiliki hasil tertinggi yaitu 2.40×10^8 cfu/g.

Seiring dengan semakin meningkatnya permintaan konsumen terhadap probiotik mendorong para peneliti melakukan perluasan sumber BAL. Beberapa penelitian yang telah dilakukan terkait BAL adalah isolasi dan identifikasi spesies BAL penghasil senyawa antimikroba asal kolon sapi bali [9], seleksi dan karakterisasi BAL asal bekasam sebagai probiotik [10], BAL merupakan bakteri yang umum digunakan sebagai probiotik, namun tidak semua BAL termasuk bakteri probiotik. Untuk dapat dikategorikan sebagai probiotik, salahsatunya BAL harus tahan terhadap kondisi pencernaan yang ekstrim. Bakteri probiotik memiliki kemampuan dan karakteristik yang berbeda-beda. Berdasarkan hal tersebut dalam penelitian ini dilakukan pengujian BAL asal joruk maman terhadap kondisi pencernaan, serta identifikasi dan karakterisasi untuk

mengetahui genus bakteri probiotik asal joruk maman.

METODE

Bahan

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat BAL yang diisolasi dari hasil fermentasi joruk maman. Joruk Maman diperoleh dari Desa Bunga Tanjung Kabupaten Rokan Hulu, Riau.

Fermentasi Joruk Maman

Tanaman Maman (*Cleome gynandra* L) dipisahkan dari daun dan batangnya, ditimbang daunnya sebanyak 1 kg. Daun dicuci dan ditiriskan sebagai bahan baku dalam pembuatan produk fermentasi ini. Bahan lain yang digunakan adalah nasi putih sebanyak 10%, garam dapur 5% dan air steril dengan perbandingan 1:4 (semua persentase dihitung dari volume air matang yang digunakan) terhadap daun Maman. Garam dapur sebanyak 5% dilarutkan dengan air matang. Daun Maman (*Cleome gynandra* L) direndam dengan larutan garam dan ditaburi dengan nasi putih sebanyak 10%. Fermentasi dilakukan di dalam toples kaca steril tertutup selama 1 hari pada suhu kamar.

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sebanyak 10 mL sampel ditambahkan dengan 90 mL NaCl fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10⁻¹ dan selanjutnya dibuat pengenceran berseri sampai 10⁻³. Dari pengenceran 10⁻³ tersebut, ditanam 10 µL pada media MRS agar yang telah ditambahkan indikator pH bromcresol purple, kemudian diinkubasi pada kondisi anaerob suhu 37°C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh terlihat berwarna kuning sebagai karakteristik dihasilkannya asam [11].

Ketahanan hidup isolat BAL pada pH lambung (pH 2.0) dan pH usus (pH 7.2) [12]

Satu mL kultur BAL umur 24 jam dicampurkan ke dalam 9 mL phosphate buffer saline (PBS) steril pH 2.0 dan pH 7.2 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama tiga jam. Bakteri asam laktat yang tumbuh dihitung dengan pengenceran pada buffer pepton water (BPW) dan media pemupukan pada media man rogosa sharpe agar (MRSA) dalam kondisi anaerobik pada suhu 37°C selama 48 jam. Populasi awal BAL umur 24 jam juga

dihitung. Ketahanan terhadap pH rendah dihitung berdasarkan perbandingan populasi BAL yang tumbuh pada pH perlakuan dengan populasi awal. Percobaan ini dilakukan dengan dua kali ulangan secara duplo.

Karakterisasi dan identifikasi isolat BAL

Karakterisasi isolat BAL terpilih meliputi morfologi koloni dan morfologi sel yang terdiri dari bentuk sel, pewarnaan Gram dan spora, pengamatan sifat fisiologis meliputi motilitas, katalase, uji tipe fermentasi, amilolitik dan lipolitik.

1). Pewarnaan Gram [13]

Bakteri terlebih dahulu difiksasi dengan cara sebagai berikut: 1 ose isolat bakteri disebarkan tipis dan merata diatas kaca objek dan dipanaskan pada api kecil secara tidak langsung (fiksasi) kemudian diangin-anginkan di udara hingga kering dan membentuk lapisan kultur yang kering dan merata. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara meneteskan pewarna kristal violet secara merata di atas kultur pada kaca objek dan didiamkan selama 1 menit, membilas dengan air mengalir kecil secara hati-hati. Sisa air diserap dengan menggunakan kertas hisap. Larutan lugol diteteskan pada sampel dan didiamkan selama 1 menit dan dibilas dengan alkohol dan aquades lalu dikeringkan. Sampel diteteskan larutan safranin dan didiamkan selama 10 detik dan dibilas dengan air mengalir dengan cepat, kemudian dikeringkan dengan tisu. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop menggunakan lensa objektif (1000x). Bakteri Gram-positif berwarna ungu sedangkan bakteri Gram-negatif berwarna merah.

2). Pewarnaan spora [13]

Bakteri digoreskan pada gelas objek yang bersih dan difiksasi. Sampel diteteskan malachite green dan dipanaskan di atas bunsen tetapi tidak sampai mendidih atau mengering. Setiap kali pewarna menjadi kering meneteskan lagi pewarna baru lalu dibilas dengan air selama beberapa detik dan dikeringkan dengan menggunakan kertas tissue. Sampel diteteskan larutan safranin selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir/kran dengan cepat, lalu dikeringkan dengan kertas tissue. Hasil pewarnaan diamati, spora bakteri akan

terlihat berwarna hijau sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah.

3) Uji motilitas [14]

Bakteri diinokulasikan secara vertikal pada media sulfide indol motility (SIM) dan di inkubasi selama 24 jam. Motilitas bakteri ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan pada permukaan medium dan tidak ada bekas pada tusukan. Bakteri non motil tumbuh sepanjang tusukan.

4) Uji katalase [15]

Satu ose isolat diambil dari media pertumbuhan MRSA dan diletakkan pada gelas obyek yang bersih. Sampel diteteskan pereaksi H₂O₂ 3% serta dibiarkan beberapa saat. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung. Hasil uji negatif menunjukkan ciri bakteri probiotik.

5) Identifikasi isolat BAL dengan API 50 CHL

Kultur BAL digores pada media MRSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur BAL dipanen dan dimasukkan ke dalam media API 50 CHL dan dihomogenkan dengan vortex. Penyiapan kit dilakukan dengan memasukkan air steril pada sumur kit dengan menggunakan mikropipet untuk mengkondisikan suasana tetap lembab. Memasukkan strips pada kit dengan urutan strip biru diletakkan pada baris pertama dan kedua pada kit, strips hijau baris ketiga dan keempat dan strips merah diletakkan pada baris terakhir pada kit. Media API 50 CHL yang telah dihomogenkan dengan BAL dimasukkan kedalam sumuran strips dengan mikropipet, menutup sumuran strips dengan mineral oil untuk memberikan lingkungan anaerob dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Parameter uji adalah perubahan warna setelah diinkubasi selama 24 jam. Hasil pengamatan diolah menggunakan software Apiweb TM.

Analisis Data

Data kuantitatif yang diperoleh dari hasil pengujian disajikan dalam bentuk rata-rata dan standar deviasi. Data-data kualitatif diolah dengan melihat ada atau tidaknya suatu komponen dalam sampel.

Data yang telah diolah selanjutnya dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dilakukan dengan cara menumbuhkan hasil fermentasi joruk maman pada Media de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Agar. Isolasi BAL ini bertujuan untuk mendapatkan isolat terpilih untuk uji selanjutnya. Isolat yang tumbuh membentuk koloni yang terlihat berwarna kuning (Gambar 1) sebagai karakteristik dihasilkannya asam.



Gambar 1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi isolat BAL terpilih meliputi morfologi koloni dan morfologi sel yang terdiri dari bentuk sel, pewarnaan Gram dan spora, pengamatan sifat fisiologis meliputi motilitas dan uji katalase. Hasil Pengujian dapat dilihat pada Tabel .1.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi BAL Joruk Maman

Variabel	Hasil
1.gram dan bentuk sel	Positif, batang
2.Spora	Tidak ada
3.Katalase	Negatif
4.Motilitas	Non motil

Sumber: Data primer

Hasil karakterisasi menunjukkan isolat BAL Joruk Maman berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram-positif, tidak membentuk spora, katalase negatif serta non motil (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Axelsson (2004) [16] bahwa Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram positif, berbentuk bulat atau batang, tidak membentuk spora, bersifat katalase negatif, mampu

memfermentasi karbohidrat dan merupakan kelompok mikroaerofilik. Savadago et al. (2006) [2] menambahkan bahwa selain dari kelompok bakteri Gram-positif, tidak membentuk spora serta berbentuk batang dan bulat, BAL juga tidak memiliki alat gerak atau non motil.

Ketahanan hidup isolat BAL pada pH lambung (pH 2.0) dan pH usus (pH 7.2) [12]

Sifat pertama yang harus dimiliki BAL pada saat akan melakukan seleksi BAL probiotik adalah ketahanan isolat BAL tersebut terhadap tingkat keasaman yang tinggi. Isolat probiotik harus dapat melewati kondisi ekstrim dengan keasaman yang tinggi [17]. Hasil pengujian isolat BAL asal Joruk Maman dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Karakterisasi BAL Joruk Maman

Populasi Awal (log cfu/ml)	Populasi Akhir (log cfu/ml)	Ketahanan Hidup (%)
6.78	pH 2.0	6.31
	pH 7.2	6.52
		93.07
		96.13

Populasi awal merupakan populasi isolat BAL setelah ditumbuhkan pada media MRSB pada suhu 37°C selama 24 jam, yang juga digunakan pada pengujian ketahanan terhadap pH. Pada Tabel.1 dapat dilihat populasi awal isolat BAL joruk maman adalah 7.68 log cfu/mL. Kondisi isolat pada pH 2.0 dan pH 7.2 mengalami penurunan populasi tidak lebih dari 2 log cfu/mL, dengan ketahanan hidup yang tinggi yaitu 93.07% dan 96.13%. Menurut Lin et al. (2006) [12], ketahanan hidup BAL pada kondisi pH 2.0 yang lebih besar atau sama dengan 50% dinyatakan mempunyai ketahanan hidup yang tinggi.

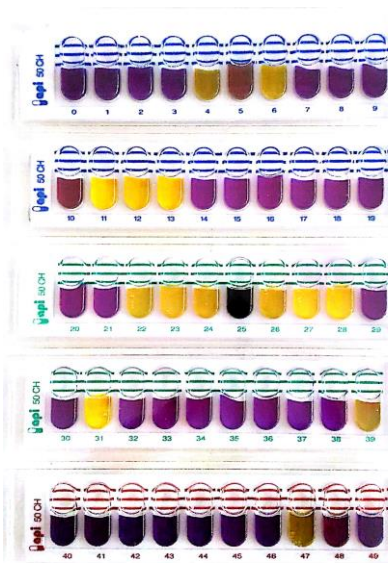
Faktor utama penentu ketahanan bakteri melewati lambung sampai dengan usus halus adalah pH lambung. Makanan yang masuk berperan sebagai bufer dan merupakan tekanan awal BAL masuk ke dalam tubuh manusia adalah terpapar asam lambung, dengan tingkat pH yang sangat rendah yaitu sekitar 2.0 pada

kondisi lambung kosong dan sekitar 3.0 pada kondisi lambung berisi [18].

Bakteri yang masuk ke dalam lambung akan mengalami penurunan populasi karena terpapar asam lambung (HCL) dengan tingkat pH yang sangat rendah yaitu sekitar 2.0 dan adanya garam empedu pada usus halus bagian atas, sehingga jumlah populasi bakteri probiotik memiliki standar minimal 10^6 cfu/mL agar ketika sampai pada usus halus jumlah populasi bakteri probiotik masih mendominasi dibanding bakteri patogen. Sanz dan Santacruz (2010) [19] juga melaporkan bahwa jumlah sel mikroba hidup yang harus terdapat pada produk probiotik bervariasi tergantung genusnya, namun pada umumnya minimal sebesar 10^6 - 10^8 cfu/mL. Shah (2007) [20] menambahkan bahwa jumlah minimal strain probiotik yang ada dalam produk makanan adalah sebesar 10^6 cfu/g atau jumlah strain probiotik yang harus dikonsumsi setiap hari sekitar 10^8 cfu/g, dengan tujuan untuk mengimbangi kemungkinan penurunan jumlah bakteri probiotik pada saat berada dalam jalur pencernaan.

Identifikasi isolat BAL dengan API 50 CHL

Identifikasi dilakukan untuk melihat kemiripan atau kekerabatan bakteri asam laktat yang diisolasi dari Joruk Maman dengan spesies yang telah teridentifikasi. API tes kit 50 CHL dapat digunakan untuk mengidentifikasi genus bakteri hingga tingkat spesies. Pengujian dengan API Kit Test berdasarkan pada kemampuan bakteri asam laktat (BAL) untuk memfermentasi karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon dan sumber energi utama untuk pertumbuhan bakteri. Namun setiap spesies bakteri memiliki kemampuan yang tidak sama dalam memfermentasi jenis karbohidrat. Oleh karena itu pengujian kemampuan memfermentasi karbohidrat dapat digunakan sebagai dasar identifikasi bakteri asam laktat (BAL). Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat BAL joruk mamanan mampu mendegradasi 18 komponen gula yaitu komponen gula no: 4, 6, 10, 11, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 39, dan 47 (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil identifikasi isolat BAL Joruk mamanan pada perangkat Kit API 50 CHL.

Dengan memperhatikan tabel pada produk kit API 50 CHL, isolat BAL Joruk mamanan teridentifikasi sebagai *Weissella confusa* dengan nilai ID 99.6% dan nilai T (typical index) sebesar 0.94, kriteria identifikasi adalah *very good identification*. Nilai T sebesar 1.0 menunjukkan bahwa semua pola reaksi fermentasi isolat yang diuji cocok (sesuai) dengan profil spesies yang ada di database.

SIMPULAN

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari Joruk mamanan memiliki potensi sebagai kandidat probiotik yaitu memiliki ketahanan hidup yang tinggi pada pH lambung (97.07%) dan pH usus (96.13%). Karakteristik isolat BAL Joruk mamanan yaitu berbentuk batang, bakteri gram positif, tidak membentuk spora, katalase negatif dan non motil serta teridentifikasi sebagai *Weissella confusa*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan pada Poltekkes Kemenkes Riau yang telah mendanai penelitian ini melalui program penelitian calon dosen Pusat penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] E. J. Smid and L. G. M. Gorris, *Natural antimicrobials for food preservation in Gálvez et al. 2014. Food Biopreservation, SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. 2007.
- [2] S. Aly, O. C. A. T, B. I. H. N, and T. S. Alfred, "Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview," *African J. Biotechnol.*, vol. 5, no. 9, pp. 678–683, 2006.
- [3] J. I. Candra, W. Zahiruddin, and Desniar, "Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari produk bekasam ikan bandeng (," *Bul. Teknol. Has. Perikan.*, vol. X, no. 2, pp. 14–24, 2007.
- [4] M. C. Collado, J. Meriluoto, and S. Salminen, "In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus," *Food Res. Int.*, vol. 40, no. 5, pp. 629–636, 2007.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and W. H. O. (WHO), "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food," London Ontario, Canada, 2002.
- [6] D. Granato, G. F. Branco, F. Nazzaro, A. F. Faria, and A. G. Cruz, "and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, pp. 292–302, 2010.
- [7] N. Karthikeyan, A. Elango, G. Kumaresan, T. R. Gopalakrishnamurthy, and B. V. Raghunath, "Enhancement Of Probiotic Viability In Ice Cream By Microencapsulation," *Int. J. Sci. Environ. Technol.*, vol. 3, no. 1, pp. 339–347, 2014.
- [8] Muharni and L. Restusari, "Optimization of lactic acid bacteria content in maman fermentation (Cleome Gynandra L.)," 2016.
- [9] S. A. Lindawati and I. W. Suardana, "Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria Species Producing Anti-Microbial Substance Isolated From Colon Of Bali Cattle," *Vet. J.*, vol. 17, no. 4, pp. 576–581, 2016.
- [10] A. Nurnaafi, "Selection and characterization of lactic acid bacteria from bekasam as probiotic," Bogor, 2016.
- [11] I. W. Suardana, I. K. Suada, I. M. Sukada, and I. N. Suarsana, "Isolation and identification of lactic acid bacteria SR9 rumen origin of bovine cow as probiotic superior candidate," *Med. Sci. journals Indones.*, vol. 40, no. 2, pp. 100–103, 2009.
- [12] W. H. Lin, C. F. Hwang, L. W. Chen, and H. Y. Tsen, "Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria product," *Food Microbiol.*, vol. 23, no. 1, pp. 74–81, 2006.
- [13] L. Waluyo, *Basic Method Techniques in Microbiology*. Malang (ID): UMM Press, 2010.
- [14] R. P. Tiwari, G. S. Hoondal, and R. Tewari, *Laboratory techniques in microbiology & biotechnology*. New Delhi (IN): Abhishek Publication, 2009.
- [15] S. Fardiaz, "Guide to basic microbiology," Bogor (ID), 1989.
- [16] L. Axelsson, "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology," pp. 1–66, 2004.
- [17] E. Tuomola, R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, and S. Salminen, "Quality assurance criteria for probiotic bacteria 1 – 4," *Am. Soc. Clin. Nutr.*, vol. 73, pp. 393–398, 2001.
- [18] E. B. Minelli et al., "Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods," *Int. Dairy J.*, vol. 14, no. 8, pp. 723–736, 2004.
- [19] Y. Sanz, A. Santacruz, and P. Gauffin, "International Immunonutrition Workshop Session 8 : Probiotics in the defence and metabolic balance of the organism Gut microbiota in obesity and metabolic disorders," *Proc. Nutr. Soc.*, no. 69, pp. 434–441, 2010

[20] N. P. Shah, "Functional cultures and health benefits," *Int. Dairy J.*, vol. 17, no. 11, pp. 1262–1277, 2007.