

JURNAL BIOLOGI UDAYANA

P-ISSN: 1410-5292 E-ISSN: 2599-2856

Volume 28 | Nomor 1 | Juni 2024

DOI: <https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2024.v28.i01.p02>

Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu sapi di Indonesia

Isolation and characterization of lactic acid bacteria from cow's milk in Indonesia

Marcelia Sugata*, Meiryanti Layarda, Ferren Chrislin, Tan Tjie Jan

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia – 15811

*Email: marcelia.sugata@uph.edu

Diterima
5 Maret 2023

Disetujui
2 April 2024

INTISARI

Susu sapi merupakan sumber nutrisi yang memberikan dampak baik bagi kesehatan dan mengandung keanekaragaman mikroorganisme, salah satunya bakteri asam laktat (BAL) seperti *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus* sp. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi BAL dari susu sapi perah Friesian Holstein di Indonesia. Selain itu, dilakukan enumerasi BAL untuk mengetahui populasi BAL pada sampel susu sapi. Berdasarkan hasil yang diperoleh, sebanyak 4,36 log CFU/mL BAL berhasil dienumerasi pada sampel susu sapi. Pengamatan morfologi sel menunjukkan adanya 15 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus* yang merupakan Gram positif, tidak membentuk endospora, dan tidak memiliki lapisan lilin pada dinding selnya. Selanjutnya, hasil negatif uji kalatase ditunjukkan oleh 10 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus*. Hasil uji fermentasi gula menunjukkan bahwa isolat STRP1 dan STRP4 diduga merupakan *Streptococcus* sp., sedangkan isolat *Lactobacillus* kemungkinan merupakan *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, dan *L. helveticus*. Uji hemolitik mengindikasikan bahwa STRP1 merupakan *S. thermophilus* dengan aktivitas hemolitik alfa. Konfirmasi spesies dari isolat-isolat yang diperoleh sebaiknya dilakukan melalui identifikasi molekuler dan karakterisasi lebih lanjut.

Kata kunci: *Lactobacillus*, probiotik, starter culture, *Streptococcus*, yoghurt

ABSTRACT

Cow's milk is a source of nutrition that has a good impact on health and contains a variety of microorganisms, one of which is lactic acid bacteria (LAB) such as *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* sp. Therefore, this study aimed to isolate and characterize LAB from the milk of Friesian Holstein dairy cows in Indonesia. In addition, BAL enumeration was carried out to determine the population of LAB in cow's milk samples. Based on the results obtained, as many as 4.36 log CFU/mL of LAB was successfully enumerated in the sample. Cell morphology observations showed that there were 15 *Streptococcus*, and 35 *Lactobacillus* candidate isolates which were Gram positive, did not form endospores, and did not have a wax coating on their cell walls. Furthermore, negative results of the catalase test were shown by 10 *Streptococcus* and 35 *Lactobacillus* candidate isolates. Carbohydrate fermentation test showed that isolate STRP1 and STRP4 were suspected to be *Streptococcus* sp., while the *Lactobacillus* isolates were possibly *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, and *L. helveticus*. The hemolytic test indicated that STRP1 is *S. thermophilus* with alpha hemolytic activity. Confirmation of the species of the isolates should be done through molecular identification and further characterization.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotic, starter culture, *Streptococcus*, yoghurt

PENDAHULUAN

Susu sapi merupakan salah satu produk hasil ternak dengan tingkat konsumsi yang tinggi secara global. Konsumsi susu sapi diketahui dapat memberikan berbagai manfaat kesehatan bagi manusia karena adanya kandungan nutrisi esensial seperti lemak, protein, mineral, dan vitamin (Robinson, 2019). Selain mengandung berbagai nutrisi, susu sapi merupakan sumber berbagai jenis mikroorganisme, terutama bakteri asam laktat (BAL). BAL didefinisikan sebagai sekelompok mikroorganisme dengan ciri serupa yang dapat menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari proses fermentasi gula, khususnya laktosa (Mozzi, 2016). Berdasarkan fungsinya, BAL terbagi menjadi dua kategori yang berkolerasi satu sama lain, yaitu *starter culture* dan probiotik (Puniya, 2015). *Starter culture* merupakan kumpulan mikroorganisme yang memicu terjadinya proses fermentasi pada suatu produk makanan dengan perannya yang bersifat spesifik. Definisi probiotik menurut FAO/WHO (2022) adalah mikroorganisme hidup yang ketika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat bagi kesehatan inang.

BAL memiliki enzim-enzim yang mampu menghidrolisis karbohidrat, protein, dan lipid sehingga memberikan variasi rasa, aroma, dan tekstur pada produk makanan. Aktivitas BAL juga dilaporkan mampu meningkatkan nilai gizi dari suatu produk pangan. Oleh karena itu, BAL banyak diaplikasikan sebagai *starter culture* untuk memproduksi bahan makanan olahan susu seperti yoghurt dan keju (Thierry et al, 2015). Aktivitas BAL juga dapat mengurangi kandungan laktosa pada susu sehingga menjadikan produk fermentasi susu lebih aman jika dikonsumsi oleh individu yang intoleran terhadap laktosa. Selain pada makanan fermentasi, BAL sebagai probiotik dapat ditemukan pada berbagai produk suplemen komersil yang telah beredar di masyarakat.

Berbagai negara, termasuk Indonesia, telah banyak melakukan penelitian mengenai BAL pada susu sapi. Namun faktor-faktor seperti kondisi lingkungan, pakan yang digunakan, dan jenis sapi dapat menyebabkan keberagaman mikrobiota pada susu sapi. Bahkan, tidak jarang beberapa *strain* berbeda dari spesies yang sama dapat ditemukan dari sumber susu yang sama. Umumnya suatu spesies memiliki karakteristik yang sama, tetapi *strain* tertentu dapat memiliki beberapa karakteristik yang bersifat spesifik (Sullivan & Cotter, 2017). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi BAL, khususnya *Lactobacillus* sp. dan *Streptococcus thermophilus*, yang berpotensi untuk digunakan sebagai *starter culture* dan dapat menjadi kandidat probiotik.

MATERI DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar (B202) dan Lanjutan (B407), Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia. Penelitian berlangsung dari bulan Januari hingga Juni 2021.

Bahan dan alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, mikroskop, inkubator (suhu 37 °C), kulkas (suhu 10 °C), timbangan meja, spatula, laminar air-flow, Erlenmeyer, botol Durant, cawan petri, *spreader*, bunsen, korek api, *sprayer* alkohol, botol semprot, mikropipet dan tips, pemanas air, vial, ose, *candle jar*, lilin, kaca objek, pipet tetes, tabung reaksi dan rak, *microtube* 1,5 mL, tabung Falcon, *cool box*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium de Man, Rogosa, and Sharpe Agar (MRSa) dan medium de Man, Rogosa, and Sharpe

Broth (MRSB) (Merck, Jerman), pepton, *beef extract*, *blood base agar*, darah domba, *plastic wrap*, aluminium foil, alkohol 70% dan 96%, spiritus, tissue, akuades, *pepton saline water*, kristal violet, iodine, alkohol 96%, safranin, minyak imersi, malakit hijau, H₂O₂ 3%, plastik tahan panas, mannitol, glukosa, sukrosa, NaCl, metilen biru 0,1%, alkohol asam 3%, *carbol fuchsin* 1%, fenol merah.

Metode

Pengambilan sampel

Sampel susu segar diperoleh dari sapi Friesian Holstein (HF) di Peternakan Pak Sofian, Kabupaten Pedes, Kecamatan Sereal, Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak satu kali dan dilakukan secara aseptis. Bagian puting sapi dibersihkan dengan air steril dan kapas rendaman alkohol 70% sebelum pengambilan sampel. Saat pengambilan sampel digunakan sarung tangan yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Sekitar 5 mL susu pada perahan pertama dibuang, lalu susu perahan kedua diambil dan disimpan dalam tabung steril. Selama pengiriman ke laboratorium untuk dianalisis, tabung ditempatkan dalam *cool box* (4°C) untuk menjaga kualitas sampel susu.

Enumerasi kandungan bakteri asam laktat

Sampel susu sapi diencerkan bertingkat dengan *pepton saline water* (PSW) 0,1% (1 L akuades yang mengandung 1 g pepton dan 8,5 g NaCl). PSW merupakan larutan fisiologis dengan suplementasi pepton yang berperan mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik dan memberi sedikit nutrisi untuk mikroorganisme sehingga integritas sel dapat terjaga dan viabilitas sel tetap tinggi selama proses pengenceran berlangsung. Sebanyak 50 µl dari hasil pengenceran 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² diinokulasikan pada medium MRSA dengan metode sebar (*spread plate method*), diikuti dengan inkubasi secara mikroaerofilik pada 37°C selama 48 jam. MRSA digunakan sebagai medium untuk menumbuhkan BAL karena merupakan medium selektif dengan nutrisi kompleks yang mampu mendukung pertumbuhan BAL (Angelis & Rizzello, 2011). Dengan demikian, semua koloni yang tumbuh pada medium MRSA saat proses isolasi dihitung sebagai perkiraan kandungan BAL pada sampel susu sapi segar. Setelah inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dan jumlah koloni tunggal (CFU) dihitung secara manual. Konsentrasi bakteri asam laktat (CFU/mL) dalam sampel susu sapi dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi BAL} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{jumlah koloni tunggal (CFU)}}{\text{volume inokulasi (mL)}} \times \text{faktor dilusi}$$

Isolasi dan pemurnian bakteri asam laktat

Setelah dihitung, dilakukan pemilihan beberapa koloni tunggal dengan morfologi yang menyerupai spesies *Streptococcus* dan *Lactobacillus*. Menurut Andrian et al (2018), species *Streptococcus thermophilus* memiliki koloni berbentuk bulat, margin *entire*, tekstur *smooth*, tidak berpigmentasi dan elevasi *flat* saat ditumbuhkan pada MRSA. Menurut Bratcher (2018), morfologi koloni dari spesies *Lactobacillus* pada MRSA adalah berwarna putih, berbentuk bulat, elevasi *convex* atau *raised*, margin *entire*, serta berukuran sedang maupun besar. Koloni tunggal yang dipilih selanjutnya dimurnikan dengan metode *four-way streak* sebanyak tiga kali. Selama proses pemurnian, inkubasi dilakukan secara mikroaerofilik pada 37°C selama 24 jam. Isolat yang telah murni selanjutnya dikarakterisasi secara morfologi dan biokimia.

Pengamatan morfologi isolat bakteri asam laktat

Pengamatan morfologi sel isolat dilakukan secara mikroskopis setelah dilakukan pewarnaan seperti pewarnaan Gram, endospora, dan tahan asam. Pewarnaan dilakukan berdasarkan metode dari Cappuccino & Welsh (2019) dengan sedikit modifikasi. Untuk pewarnaan, isolat diinokulasikan ke tetesan air pada kaca objek. Setelah itu, kaca objek dipanaskan di atas bunsen hingga terbentuk apusan kering. Semua hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran total 1000x menggunakan bantuan minyak imersi.

Pewarnaan Gram dilakukan dengan meneteskan kristal violet pada apusan kering lalu didiamkan selama satu menit dan dibilas dengan air. Lalu, apusan ditetesi iodin, didiamkan selama satu menit, dan dibilas dengan air. Apusan dibilas dengan alkohol 96% sebagai dekoloran lalu langsung dibilas dengan air. Selanjutnya, apusan ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 15 detik dan dibilas dengan air. Setelah kering, dilakukan pengamatan preparat.

Pewarnaan endospora dilakukan dengan mempersiapkan apusan kering isolat yang kemudian diletakkan di atas *water bath*. Apusan ditetesi dengan malakit hijau dan didiamkan selama 5 menit, lalu dibilas dengan air. Setelah itu, apusan ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air. Setelah kering, dilakukan pengamatan preparat.

Pewarnaan tahan asam dilakukan dengan mempersiapkan apusan kering isolat yang kemudian diletakkan di atas *water bath*. Apusan ditetesi dengan *carbol fuschin* dan didiamkan selama 2 menit, lalu dibilas dengan air. Setelah itu, apusan dibilas dengan alkohol asam (3% HCl dalam alkohol 96%). Apusan dibilas kembali dengan air lalu ditetesi metilen biru dan didiamkan selama 1 menit. Kelebihan pewarna dibilas dengan air lalu preparat dikeringkan. Setelah kering, dilakukan pengamatan preparat.

Uji aktivitas biokimia isolat bakteri asam laktat

Aktivitas biokimia yang diuji meliputi produksi enzim kalatase dan kemampuan memfermentasi gula (monosakarida: glukosa, disakarida: sukrosa, gula alkohol: manitol). Untuk kandidat *S. thermophilus* dilakukan pula uji kemampuan mendegradasi sel darah merah (hemolitik).

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan 2-3 tetes H₂O₂ 3% ke apusan basah isolat pada kaca objek (Mulaw et al, 2019). Terbentuknya gelembung gas mengindikasikan bahwa isolat menghasilkan enzim katalase.

Kemampuan isolat memfermentasi gula diuji berdasarkan metode dari Liang et al. (2018). Medium *phenol red carbohydrate broth* (10 g pepton, 5 g NaCl, 10 g gula, 1 g *beef extract* dan 180 mg fenol merah dalam aquades dengan total volum 1 L) dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi tabung durham yang diletakkan secara terbalik. Medium disterilisasi dengan autoklaf lalu isolat diinokulasikan menggunakan ose dan diinkubasi secara mikroaerofilik pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan untuk melihat perubahan warna medium dan produksi gelembung udara pada tabung durham. Hasil positif fermentasi gula dapat berupa produksi asam yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna medium dari merah menjadi kuning atau produksi asam dan gas yang ditunjukkan dengan perubahan warna medium dan adanya gelembung udara pada tabung durham.

Uji aktivitas hemolitik dilakukan berdasarkan metode dari Abdullah et al (2018). Medium *blood base agar* dibuat dan disterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah suhu medium mencapai 40 – 50 °C, sel darah merah dari domba (7%) ditambahkan secara aseptik. Selanjutnya, agar darah dituang ke dalam cawan

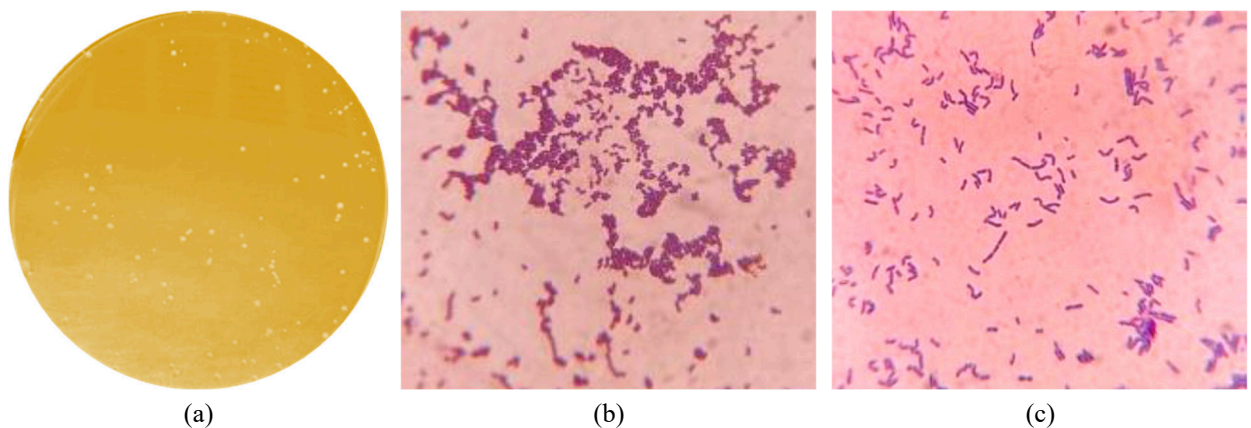
petri dan dibiarkan hingga mengeras. Isolat diinokulasikan ke permukaan agar darah dengan metode gores, lalu diinkubasi secara mikroaerofilik pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Analisis data

Proses analisis data dilakukan dengan metode deskriptif. Seluruh data yang diperoleh dideskripsikan dan didukung dengan gambar dan tabel. Hasil karakterisasi isolat digunakan untuk identifikasi berdasarkan panduan dari *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* Edisi 2 dan publikasi ilmiah lainnya.

HASIL

Hasil enumerasi menunjukkan bahwa kandungan BAL pada sampel susu sapi segar adalah $2,28 \times 10^4$ CFU/mL atau 4,36 log CFU/mL (data tidak ditampilkan). Dari hasil isolasi dipilih 100 koloni tunggal untuk dimurnikan, 50 koloni dengan morfologi *Streptococcus* dan 50 koloni dengan morfologi *Lactobacillus*. Setelah pemurnian dan karakterisasi, sebanyak 15 isolat menunjukkan morfologi sel yang sesuai dengan spesies *Streptococcus* dan sebanyak 35 isolat memiliki morfologi sel *Lactobacillus* (Tabel 1). Morfologi koloni dari isolat *Streptococcus* adalah berbentuk bulat, memiliki margin *entire*, bertekstur *smooth*, tidak berpigmentasi dan memiliki tingkat elevasi *flat*, sedangkan morfologi selnya adalah berbentuk bulat, Gram positif, tidak membentuk endospora, tidak mengandung lapisan lilin pada dinding selnya. Morfologi koloni dari isolat *Lactobacillus* adalah berwarna putih, berbentuk bulat, elevasi *convex* atau *raised*, margin *entire*, dan berukuran sedang maupun besar, sedangkan morfologi selnya adalah berbentuk batang, Gram positif, tidak membentuk endospora, tidak mengandung lapisan lilin pada dinding selnya.



Gambar 1. Morfologi isolat BAL: (a) morfologi koloni pada media MRSA; (b) morfologi sel dari isolat kandidat *Streptococcus* dan (c) morfologi sel dari isolat kandidat *Lactobacillus* setelah pewarnaan Gram

Setelah pengamatan morfologi, dilakukan uji aktivitas biokimia yang meliputi uji produksi enzim katalase dan uji kemampuan fermentasi gula. Tabel 2 dan Tabel 3 menunjukkan hasil uji aktivitas biokimia dari 15 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus*. Berdasarkan hasil uji katalase, 10 dari 15 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus* menunjukkan hasil negatif. Oleh karena itu, uji fermentasi glukosa, sukrosa dan mannitol dilakukan pada 10 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus*. Hasil fermentasi gula yang diamati dapat

berupa asam (terjadi perubahan warna pada medium) dan/atau gas (terdapat gelembung pada tabung durham).

Tabel 1. Hasil pengamatan morfologi isolat BAL

| Kode isolat | | | Bentuk | Gram | Endospora | Tahan asam |
|-------------|--------|--------|--------|------|-----------|------------|
| STRP1 | STRP6 | STRP11 | Kokus | + | - | - |
| STRP2 | STRP7 | STRP12 | Kokus | + | - | - |
| STRP3 | STRP8 | STRP13 | Kokus | + | - | - |
| STRP4 | STRP9 | STRP14 | Kokus | + | - | - |
| STRP5 | STRP10 | STRP15 | Kokus | + | - | - |
| B1 | B13 | B25 | Batang | + | - | - |
| B2 | B14 | B26 | Batang | + | - | - |
| B3 | B15 | B27 | Batang | + | - | - |
| B4 | B16 | B28 | Batang | + | - | - |
| B5 | B17 | B29 | Batang | + | - | - |
| B6 | B18 | B30 | Batang | + | - | - |
| B7 | B19 | B31 | Batang | + | - | - |
| B8 | B20 | B32 | Batang | + | - | - |
| B9 | B21 | B33 | Batang | + | - | - |
| B10 | B22 | B34 | Batang | + | - | - |
| B11 | B23 | B35 | Batang | + | - | - |
| B12 | B24 | | Batang | + | - | - |

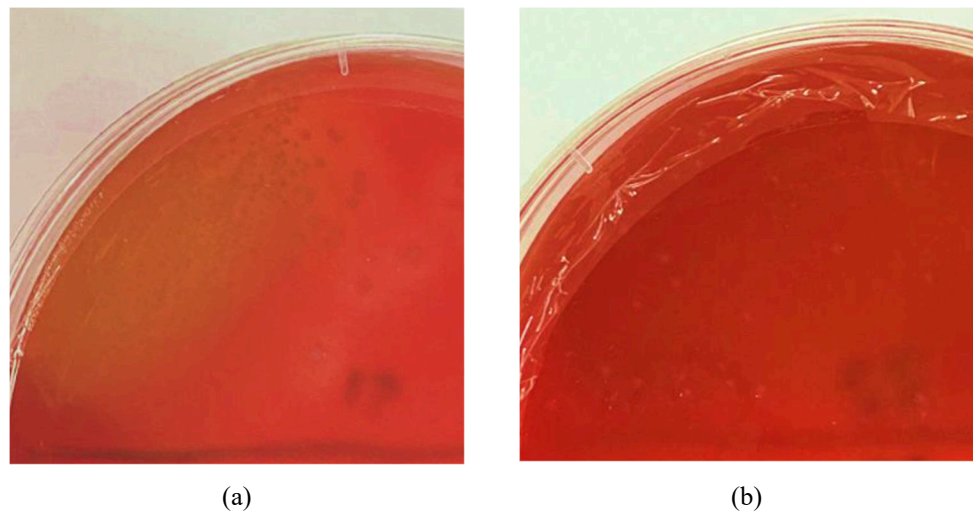
Tabel 2. Hasil uji aktivitas biokimia dari isolat BAL kandidat *Streptococcus*

| Kode isolat | | | Katalase | | | Fermentasi gula (asam/gas) | | | | | | | | |
|-------------|--------|--------|----------|---|---|----------------------------|-----|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
| | | | | | | Glukosa | | | Sukrosa | | | Manitol | | |
| STRP1 | STRP6 | STRP11 | - | + | + | +/- | N/A | N/A | +/- | N/A | N/A | -/- | N/A | N/A |
| STRP2 | STRP7 | STRP12 | - | - | - | -/- | +/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| STRP3 | STRP8 | STRP13 | + | + | - | N/A | N/A | +/- | N/A | N/A | -/- | N/A | N/A | -/- |
| STRP4 | STRP9 | STRP14 | - | - | - | +/- | +/- | -/- | +/- | -/- | -/- | -/- | +/- | -/- |
| STRP5 | STRP10 | STRP15 | + | - | - | N/A | +/+ | +/+ | N/A | -/- | -/- | N/A | -/- | -/- |

Tabel 3. Hasil uji aktivitas biokimia dari isolat BAL kandidat *Lactobacillus*

| Kode isolat | | | Katalase | | | Fermentasi gula (asam/gas) | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|----------|--|--|----------------------------|-----|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
| | | | | | | Glukosa | | | Sukrosa | | | Manitol | | |
| B1 | B13 | B25 | - | | | +/- | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| B2 | B14 | B26 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | +/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| B3 | B15 | B27 | - | | | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | -/- | +/- |
| B4 | B16 | B28 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | +/- | -/- | -/- | -/- |
| B5 | B17 | B29 | - | | | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | +/- |
| B6 | B18 | B30 | - | | | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | -/- | +/- | -/- | -/- |
| B7 | B19 | B31 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | +/- | +/- | -/- | -/- | -/- |
| B8 | B20 | B32 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| B9 | B21 | B33 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | +/- | +/- | -/- | -/- | -/- |
| B10 | B22 | B34 | - | | | +/- | +/- | +/- | -/- | -/- | +/- | -/- | -/- | -/- |
| B11 | B23 | B35 | - | | | +/- | +/- | +/- | +/- | -/- | +/- | +/- | -/- | -/- |
| B12 | B24 | | - | | | +/- | +/- | | -/- | +/- | | -/- | -/- | |

Selanjutnya, isolat BAL kandidat *Streptococcus* diuji kemampuannya untuk mendegradasi sel darah merah (hemolitik). Gambar 2 menunjukkan hasil uji hemolitik dari dua isolat kandidat *Streptococcus*.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas hemolitik (a) isolat STRP1; dan (b) isolat STRP4

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, susu sapi segar digunakan sebagai sumber BAL. Kandungan BAL pada sampel susu sapi, yaitu 4,36 log CFU/mL, sesuai dengan penelitian dari Garroni *et al.* (2020) yang melaporkan bahwa populasi BAL yang terdapat dalam susu sapi berkisar pada rentang 2,59 – 4,33 log CFU/mL. Selanjutnya, koloni tunggal dipilih dan dimurnikan hingga diperoleh isolat murni. Berdasarkan bentuk sel yang diamati dari hasil pewarnaan Gram, isolat kandidat *Lactobacillus* yang diperoleh lebih banyak daripada kandidat *Streptococcus*. Hal ini terjadi karena tingkat populasi *Lactobacillus* pada susu sapi memang cukup tinggi. Menurut penelitian oleh Taye *et al.* (2021), presentasi BAL pada susu sapi segar adalah sebagai berikut: *Lactobacillus* sebanyak 12,19%, *Lactococcus* 9,75%, *Streptococcus* 9,74%, *Leuconostoc* 4,88%, *Pediococcus* 7,3%, dan *Bifidobacterium* 7,31%. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Wassie & Wassie (2016) dan Karakas (2018).

Pertumbuhan mikroba dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti pH, suhu dan kadar oksigen. Tingkat pH yang optimal untuk pertumbuhan BAL adalah 7,4 sedangkan suhu inkubasi yang optimal adalah 37°C. BAL merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat tumbuh optimal pada kondisi dengan kadar oksigen rendah. Salah satu penyebabnya adalah ketidakmampuan BAL memproduksi enzim katalase untuk menetralkan superoksida yang dihasilkan selama saturasi oksigen (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Oleh karena itu, pada penelitian ini proses inkubasi dilakukan secara mikroaerofilik. Selain itu, uji katalase digunakan untuk menyeleksi isolat BAL, dimana isolat tanpa aktivitas enzim katalase digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Pada pengujian fermentasi gula digunakan medium *phenol red carbohydrate broth* dengan pH netral, yaitu sekitar 7,4. Medium ini mengandung fenol merah sebagai indikator pH sehingga akan berwarna merah sebelum diinokulasikan dengan bakteri. Setelah bakteri diinokulasikan dan tumbuh pada medium ini, bakteri yang memfermentasi gula dan menghasilkan asam akan

menyebabkan pH medium turun sehingga terjadi perubahan warna medium dari merah menjadi kuning (Dhameliya et al., 2020). Selain menghasilkan asam, fermentasi gula juga dapat menghasilkan gas yang dapat diamati pada tabung Durham.

Berdasarkan Tabel 4, sebanyak 16 isolat kandidat *Lactobacillus* dapat memfermentasi glukosa, 15 isolat dapat memfermentasi glukosa dan sukrosa, serta 3 isolat dapat memfermentasi glukosa, sukrosa, dan manitol, serta 1 isolat yang mampu memfermentasi glukosa dan manitol. Perkiraan spesies *Lactobacillus* berdasarkan hasil uji fermentasi gula yang dicocokkan dengan *Bergey's Manual* meliputi *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, dan *L. helveticus*. Ketiga spesies tersebut dapat ditemukan pada susu sapi dan memiliki potensi sebagai probiotik.

Tabel 4. Isolat kandidat *Lactobacillus* berdasarkan hasil uji fermentasi gula

| Spesies <i>Lactobacillus</i> sp. | Kode isolat | Gula yang difermentasi |
|---|---|---------------------------|
| <i>L. delbrueckii</i> / <i>L. acidophilus</i> | B1, B3, B5, B14, B15, B17, B18, B19, B21, B24, B28, B31, B33, B34, B35 | glukosa, sukrosa |
| <i>L. helveticus</i> | B2, B4, B7, B8, B9, B10, B12, B13, B16, B20, B22, B23, B25, B26, B30, B32 | glukosa |
| <i>L. casei</i> / <i>L. plantarum</i> | B6, B11, B29 | glukosa, sukrosa, manitol |

Menurut Vesela et al. (2019), *S. thermophilus* dapat memfermentasikan jenis gula glukosa dan sukrosa, namun tidak dapat memfermentasi manitol. Selain itu, BAL homofermentatif seperti *Streptococcus* tidak memproduksi gas pada proses fermentasi gula (Gupta et al, 2018). Isolat yang dengan aktivitas sesuai dengan deskripsi tersebut adalah isolat STRP1 dan STRP4. Berdasarkan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, jenis gula yang sebaiknya diuji untuk *S. thermophilus* adalah glukosa, sukrosa, fruktosa, laktosa, maltosa, manitol dan sorbitol. Oleh karena itu, pengujian menggunakan gula fruktosa, laktosa, maltosa dan sorbitol perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya. Isolat STRP9 diduga berasal dari genus *Enterococcus* Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yerlikaya & Akbulut (2020), *Enterococcus* dapat memfermentasikan glukosa, sukrosa dan juga manitol. Bakteri *Enterococcus* juga diketahui tidak dapat memproduksi gas dari proses fermentasi gula. Selain itu, isolat STRP10 dan STRP15 diduga berasal dari genus *Leuconostoc*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sahin et al (2019), diketahui bahwa *Leuconostoc* dapat memfermentasi glukosa dan sukrosa.

Berdasarkan uji hemolitik, isolat STRP1 menunjukkan aktivitas hemolitik alfa, sedangkan kandidat isolat STRP4 menunjukkan aktivitas hemolitik gamma. Hemolisis alfa adalah penghancuran sebagian sel darah merah, hemolisis beta adalah penghancuran total sel darah merah, dan hemolisis gamma menunjukkan tidak adanya pemecahan sel darah merah. *S. thermophilus* umumnya memiliki aktivitas hemolitik alfa, yang ditandai dengan warna kehijauan di sekitar koloni (Stephens & Turner, 2015). Genus *Streptococcus* terdiri dari beragam spesies bakteri patogenik maupun nonpatogenik. *S. pyogenes* dan *S. pneumoniae* adalah bakteri patogen yang sering ditemukan pada manusia. *S. iniae* merupakan bakteri patogen hewan laut dan *S. suis* merupakan bakteri patogen yang hewan ternak. Meski demikian, ada pula spesies *S. thermophilus* yang merupakan probiotik dan berperan penting bagi kesehatan manusia. Di industri makanan *S. thermophilus*

sering digunakan sebagai *starter culture* pembuatan yoghurt, bersamaan dengan *L. delbrueckii* (Patel & Gupta, 2018).

SIMPULAN

Susu sapi lokal mengandung BAL sebanyak $2,28 \times 10^4$ CFU/mL. Dari hasil isolasi dan purifikasi didapatkan 15 isolat kandidat *Streptococcus* (sel berbentuk kokus) dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus* (sel berbentuk batang). Berdasarkan hasil karakterisasi, semua isolat merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk endospora, tidak mengandung lapisan lilin pada dinding selnya. Berdasarkan uji katalase 10 dari 15 isolat kandidat *Streptococcus* dan 35 isolat kandidat *Lactobacillus* tidak menunjukkan aktivitas enzim katalase. Berdasarkan uji fermentasi gula, sebanyak 2 dari 10 isolat diduga sebagai *Streptococcus* sp., sebanyak 15 dari 35 isolat diduga sebagai *L. delbrueckii* dan *L. acidophilus* karena mampu fermentasi glukosa dan sukrosa, serta sebanyak 16 dari 35 isolat diduga sebagai *L. helveticus* karena mampu fermentasi glukosa. Hasil uji aktivitas hemolitik dari isolat kandidat *Streptococcus* mengindikasikan bahwa isolat STRP1 merupakan *Streptococcus thermophilus* yang menunjukkan aktivitas alfa-hemolitik, dan isolat STRP4 diduga sebagai *Streptococcus dysgalactiae* karena menunjukkan aktivitas gamma-hemolitik. Spesies dari isolat lainnya belum dapat diperkirakan berdasarkan uji yang telah dilakukan sehingga diperlukan pengujian lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan karena telah memperbolehkan penggunaan Laboratorium Biologi Dasar (203) dan Laboratorium Biologi Lanjutan (407) untuk pelaksanaan penelitian ini. Selain itu, penulis berterima kasih atas dukungan finansial yang diberikan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UPH sehingga penelitian ini dapat terlaksana (P-011-S/FaST/V/2021).

KEPUSTAKAAN

- Abbasiliasi S, Tan JS, Ibrahim TAT, Bashokouh F, Ramakrishnan NR, Mustafa S, Ariff AB. 2017. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. *RSC Advances* **7(47)**: 29395–29420.
- Abdullah R, Erfianti T, Pratama DA, Wijanarka. 2019. Isolation and screening of lactic acid bacteria from grasshopper gut as novel probiotic candidates to digest cellulose polymer. *Journal of Physics: Conference Series* **1217**: 012184.
- Andrian D, Rizkinata D, Susanto TSR, Lucy J, Tan TJ. 2018. Isolation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* as Starter Culture Candidate Originated from Indonesian Cow's Milk. *Microbiology and Biotechnology Letters* **46(3)**: 201-209.
- Angelis M, Rizzello C. 2011. *Lactobacillus* sp.: *Lactobacillus delbrueckii* group. *Journal of Daily Science* **3**: 119-124.
- Bratcher DF. 2018. Other Gram-Positive Bacilli. In Long SS, Prober CG, Fischer M (eds) *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 5th Edition. Elsevier: Amsterdam, 786–790.
- Dhameliya HA, Mesara SN, Mali H, Shah C, Subramanian RB. 2020. Biochemical and Molecular characterization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented pulses. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* **44**: 1279–1286.
- Cappuccino JG, Welsh C. 2019. *Microbiology A laboratory manual*. 12th Edition. Pearson: New York.
- FAO/WHO. 2002. *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*. FAO and WHO: Roma, 2-3.
- AO/WHO (2002) Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, World Health Organization, WHO, Guidelines for the evaluation of probiotics in food (2002)

- Garroni E, Doulgeraki AI, Pavli F, Spiteri D, Valdramidis VP. 2020. Characterization of indigenous lactic acid bacteria in cow milk of the maltese islands: A geographical and seasonal assessment. *Microorganisms* **8(6)**: 812.
- Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A. 2018. Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research* **5(10)**: 411-424.
- Karakas A. 2017. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Journal of Bioscience* **34(2)**: 385-388.
- Liang X, Sun C, Chen B, Du K, Yu T, Luang-In V, Lu X, Shao Y. 2018. Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill: An alkaliphilic silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102(11)**: 4951–4962.
- Mozzi F. 2016. Lactic acid bacteria. In: Caballero B, Finglas PM and Toldrá F (eds) *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier: Oxford, 501–508.
- Mulaw G, Tessema TS, Muleta D, Tesfaye A. 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International Journal of Microbiology* **2019**: 1–11.
- Patel S, Gupta RS. 2018. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phylogenies and molecular signatures. *Infection, Genetics and Evolution* **66**: 130-151.
- Puniya, AK. 2015. Fermented Milk and Dairy Products. 1st Edition. CRC Press: Boca Raton.
- Robinson RC. 2019. Structures and metabolic properties of bovine milk oligosaccharides and their potential in the development of novel therapeutics. *Frontiers in Nutrition* **6**: 50.
- Sahin AW, Rice T, Zannini E, Axel C, Coffey A, Lynch KM, Arendt EK. 2019. *Leuconostoc citreum* Tr116: In-situ production of mannitol in sourdough and its application to reduce sugar in burger buns. *International Journal of Food Microbiology* **302**: 80–89.
- Stephens J, Turner D. 2015. *Streptococcus thermophilus* bacteremia in a patient with transient bowel ischemia secondary to polycythemia. *JMM Case Reports* **2(3)**: 1-3.
- Sullivan O, Cotter P. 2017. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheese. Springer: New York.
- Thierry A, Pogacic T, Weber M. 2015. Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented food. In: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (eds) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 2nd Edition. John Wiley & Sons: New Jersey, 314-340.
- Taye Y, Degu T, Fesseha H. 2021. Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal* **2021**: 1-6.
- Vesela K, Kumherova M, Klojdova I, Solichova K, Horackova S, Plockova M. 2019. Selective culture medium for the enumeration of *Lactobacillus plantarum* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT* **114**: 108365.
- Wassie M, Wassie T. 2016. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* **3(8)**: 44-49.
- Yerlikaya O, Akbulut N. 2020. Identification, biochemical and technological properties of *Enterococcus* species isolated from raw milk and traditional dairy products. *Ukrainian Food Journal* **9(4)**: 809-819.