

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACID LACTIC BACTERIA FROM BALI CATTLE'S GASTRIC FLUID AS A POTENTIAL CANDIDATE OF BIOPRESERVATIVE

I Wayan Suardana¹, I Nyoman Suarsana¹,
I Nengah Sujaya² dan Komang Gede Wiryawan³

¹⁾ *Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Jl Sudirman Denpasar, Tlp.(0361) 701808. E-mail wayansuardana@plasa.com:*

²⁾ *Laboratorium Biosain dan Bioteknologi Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran Bali*

⁴⁾ *Laboratorium Ilmu Hayati, Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor Jl.Rasamala, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680*

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil antimikroba asal cairan rumen sapi bali yang nantinya berpotensi untuk dipakai sebagai biopreservatif. Bakteri penghasil senyawa antimikroba dicari dengan menumbuhkan bakteri pada media *de Mann, Rogosa, Sharpe* (MRS). Bakteri yang tumbuh kemudian diidentifikasi dengan kit *Analytical Profile Index* (API) 50 CHL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari cairan rumen sapi bali dapat diisolasi bakteri asam laktat (BAL) dengan kemampuan antimikroba yang cukup luas, baik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif yakni isolat SR21 (*Lactococcus lactis spp lactis 1*) dan isolat SR54 (*Lactobacillus brevis 1*). Bakteri asam laktat tersebut nantinya sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber biopreservatif.

Kata kunci : bakteri asam laktat, cairan rumen sapi bali, biopreservatif

ABSTRACT

A study was conducted to isolate and identify of lactic acid bacteria originated from gastric fluid of bali cattle, and to determine their potential as the candidates of biopreservative. Lactic acid bacteria were isolated by culturing the gastric fluid of bali cattle in *de Mann, Rogosa, Sharpe* (MRS) medium; screening the bacteria, and identification of bacteria species by Analytical Profile Index (API) 50 CHL Kit. The results showed that, the new species of lactic acid bacteria were isolated and identified as *Lactococcus lactis spp lactis 1* (SR21 isolate) and *Lactobacillus brevis 1* (SR54 isolate) that have broad spectrum antimicrobial activities. It is clear from this study that a potential lactic acid bacteria producing antimicrobial agent can be isolated from the gastric fluid of bali cattle.

Key words: lactic acid bacteria, bali cattle's gastric fluid, biopreservatives

PENDAHULUAN

Preservasi merupakan cara untuk mengawetkan produk pangan seperti daging dan produknya sehingga terhindar dari pembusukan akibat cemaran mikroba. Metode preservasi yang banyak digunakan untuk memperpanjang masa simpan (*shelf life*) daging/produknya adalah pendinginan pada suhu -20°C sampai 5°C (Soeparno, 2005). Selain itu, pertumbuhan mikroba perusak dapat dicegah dengan pemberian bahan preservasi kimiawi seperti nitrit, boraks, rhadomin ataupun formalin. Sampai dengan 30 tahun yang lalu, hampir semua

bahan kimia yang digunakan sebagai bahan pengawet masih bersifat toksik bagi manusia. Sementara itu, preservasi dalam lemari pendingin merupakan cara yang cukup aman dan ekonomis, tetapi memiliki beberapa keterbatasan seperti masih memungkinkan terjadinya kerusakan daging oleh kuman *psikrofilik* yang dapat tumbuh pada suhu 0^o-5^oC (Jay *et al.*, 2005). Karena itu, perlu dicari cara preservasi kimiawi yang alami dan lebih aman.

Nisin sebagai *bakteriosin* merupakan senyawa biopreservatif pertama yang diisolasi dari bakteri asam laktat *Lactococcus lactis spp.* Senyawa ini sekarang telah digunakan di 57 negara sebagai bahan pengawet makanan yang aman dan dapat mencegah pertumbuhan bakteri perusak atau bahkan bakteri patogen (Ray, 1992; Anon 2000). Menurut Sudirman (1996 *dalam* Nurliana, 1997) penggunaan *bakteriosin* sebagai *biopreservatif* memiliki beberapa keuntungan, yaitu (1) tidak toksik dan mudah mengalami biodegradasi karena merupakan senyawa protein, (2) tidak membahayakan mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan, (3) aman bagi lingkungan dan dapat mengurangi penggunaan bahan kimia sebagai bahan pengawet, dan (4) dapat digunakan dalam kultur bakteri unggul yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba terhadap bakteri patogen atau dapat digunakan dalam bentuk senyawa antimikrobia yang telah dimurnikan.

Saluran pencernaan manusia ataupun hewan diperkirakan mengandung flora normal sampai 10¹² bakteri per gram isi saluran cerna dan setidaknya-tidaknya terdiri atas 500 species yang sebagian besar merupakan bakteri asam laktat (Drasar dan Hill, 1974 *dalam* Salminen dan Wright, 1998; Gorbach, 2001). Sapi bali merupakan salah satu jenis sapi asli Indonesia yang dapat hidup hanya dengan memanfaatkan hijauan yang kurang bergizi, dan memiliki daya cerna yang tinggi terhadap makanan berserat (Bandini, 2003). Bertitik tolak dari *sifat perintis* dan *daya cernanya yang tinggi* terhadap *makanan berserat* tersebut, maka sangatlah mungkin bahwa cairan rumen sapi bali mengandung banyak bakteri asam laktat yang dapat digunakan sebagai sumber *bakteriosin* baru sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai biopreservatif.

METODE PENELITIAN

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dari cairan rumen sapi bali yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Pesanggaran Denpasar. Sebanyak 100 gram sampel cairan rumen diambil dari 20 ekor sapi dan semua sampel dicampur menjadi satu. Sebanyak 100 gram sampel campuran tersebut, selanjutnya diencerkan dengan 100 ml larutan NaCl fisiologis. Bakteri kemudian ditumbuhkan dalam media MRS (*de Mann, Rogosa, Sharpe*). Ke dalam media MRS agar yang telah disiapkan sebelumnya ditambahkan 60 ppm *bromcresol purple* (BCP) sebagai indikator pH. Sebanyak 0.1 ml sampel cairan rumen kemudian dituang ke dalam petri yang berisi 15 ml media MRS agar + BCP yang bersuhu 45^oC. Setelah padat, media MRS agar diinkubasikan pada kondisi anaerob dengan cara menambahkan 2 sachet (3600 ml H₂ dan 700 ml CO₂) *gas generating kit* ke dalam tabung anaerob untuk selanjutnya diinkubasi dengan suhu inkubasi 37^oC selama 2 hari. Adanya koloni yang tumbuh diisolasi dan selanjutnya diseleksi. Adanya BAL ditandai dengan adanya koloni bakteri yang berwarna kuning sebagai ciri dihasilkannya asam yang berperan dalam merubah warna indikator pH BCP pada media MRS agar dari ungu menjadi kuning (Garver dan Muriana, 1993).

Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil Substansi Antimikroba

Metode yang digunakan adalah metode "*direct antagonism*" dengan "*stab inoculation*" menggunakan strain indikator bakteri penguji (strain yang secara filogenik dekat). Untuk tujuan skrining, uji ini dilakukan pada media padat dan meliputi deteksi penghambatan pertumbuhan yang disebabkan oleh strain produk. Caranya adalah sebagai berikut. Sebanyak satu ose (sekitar 1 x 10⁶ cfu) bakteri strain indikator dibiakan pada permukaan media agar darah dengan cara membuat goresan lurus sepanjang garis tengah/diameter plat. Setelah dibiakan selama 24 jam, ke atas koloni bakteri yang akan diuji disentuh dengan jarum ose dan selanjutnya diletakkan di atas permukaan strain indikator yang telah digores sebelumnya dengan sedikit masuk ke

dalam media (*stab inocula*). Biakan kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Uji ini dilakukan dengan dua kali ulangan menggunakan *ose* yang sama. Adanya senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri ditandai dengan zona terang di sekitar *stab inocula*. Isolat yang menghasilkan zona hambatan terluas (diukur dalam satuan mm) dipakai sebagai bakteri penghasil substansi antimikroba pada uji lanjutan (Garver dan Muriana, 1993; Wiryawan *et al.*, 2003).

pada suhu 10°C, dan uji pertumbuhannya pada pH 9,6 (Brashears *et al.*, 2003 ; Widodo, 2003; Wilderdyke *et al.*, 2004). Penentuan species bakteri dilakukan dengan menggunakan *Standard Analytical Profile Index* (API) 50 CHL Kit (bio Meriueux, Marcy l’Etoile, France, 2006).

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif, untuk selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel atau gambar (Gaspersz, 1991; Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Substansi Antimikroba

Bakteri asam laktat dengan diameter zona bening paling luas selanjutnya diisolasi dan diidentifikasi berdasarkan sifat koloni (besar, bentuk, warna dan permukaan koloni). Idenifikasi kemudian dilanjutkan dengan uji fisiologis dan biokimia seperti pewarnaan Gram, uji katalase, uji produksi gas, uji pertumbuhannya pada NaCl 15%, uji pertumbuhan

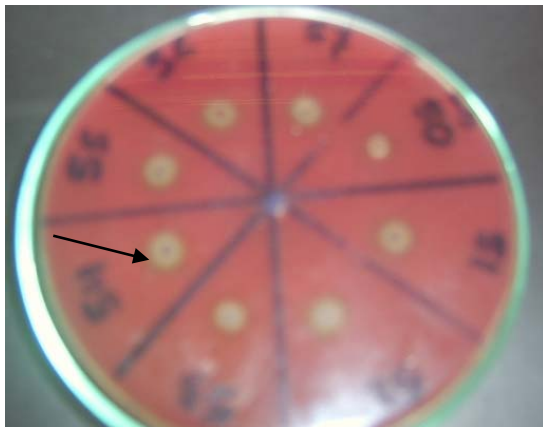
Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Cairan Rumen

Sebanyak 100 isolat bakteri asam laktat tumbuh pada media MRS agar dan setelah aktivitas antimikrobanya diuji pada media *Blood agar*, isolat SR21 dan SR54 diketahui mempunyai zona hambatan paling luas jika dibandingkan dengan isolat lainnya. Kedua isolat tersebut mempunyai ciri-ciri bakteri asam laktat (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil identifikasi isolat bakteri asam laktat dari cairan rumen sapi bali

No	Isolat	Jenis Uji	Hasil
1	Isolat SR21	1. Pewarnaan Gram	Positip
		2. Bentuk	Kokus
		3. Uji Katalase	Negatip
		4. Uji produksi gas	Negatip
		6. Uji pertumbuhan pada NaCl 15%	Negatip
		7. Uji pertumbuhan pada 10°C	Negatip
		8. Uji pertumbuhan pada pH 9,6	Negatip
		9. pH akhir dari media MRS tempat pertumbuhan isolat	3,96
		10. Diameter zone hambat pada media Blood Agar	11 mm
		2.	Isolat SR54
2. Bentuk	Batang		
3. Uji Katalase	Negatip		
4. Uji produksi gas	Negatip		
6. Uji pertumbuhan pada NaCl 15%	Negatip		
7. Uji pertumbuhan pada 10°C	Negatip		
8. Uji pertumbuhan pada pH 9,6	Negatip		
9. pH akhir dari media MRS tempat pertumbuhan isolat	3,96		
10. Diameter zone hambat pada media Blood Agar	10 mm		

Hasil karakterisasi (Tabel 1) menunjukkan bahwa isolat SR21 dapat dikelompokkan ke dalam genus *Streptococcus*. Penggolongan ini didasarkan atas metode identifikasi menurut Holzapfel dan Schillinger (1992 dalam Widodo 2003), yang menyebutkan bahwa genus *Streptococcus* memiliki ciri-ciri yaitu, pH akhir dalam media MRS < 4,6, uji katalase negatif, koloni berbentuk kokus, kokus tidak berbentuk tetrad, dan tidak tumbuh pada suhu 10°C. Isolat SR54 dapat dikelompokkan ke dalam genus *Lactococcus*. Penggolongan ini didasarkan atas cirinya, yaitu pH akhir dalam media MRS < 4,6, uji katalase negatif, dan koloninya berbentuk batang. Berdasarkan atas aktivitas metabolismenya, kedua isolat dapat dikelompokkan kedalam subgroup Homofermentatif, karena hanya mampu menghasilkan asam laktat, dan tidak mampu menghasilkan CO₂ (Widodo, 2003; Surono, 2004)

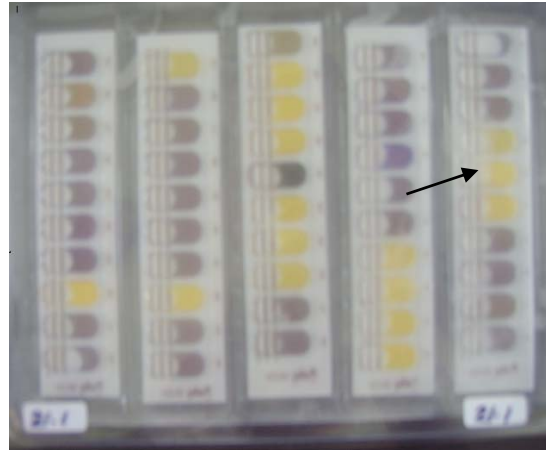


Gambar 1. Diameter *killing zone* (→) Isolat SR54 pada media *blood agar*

Mengingat diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut cukup besar yakni 11 mm untuk SR21 dan 10 mm untuk SR54, maka kedua isolat dikarakterisasi lebih lanjut.

Karakteristik Spesies Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Anti-mikroba.

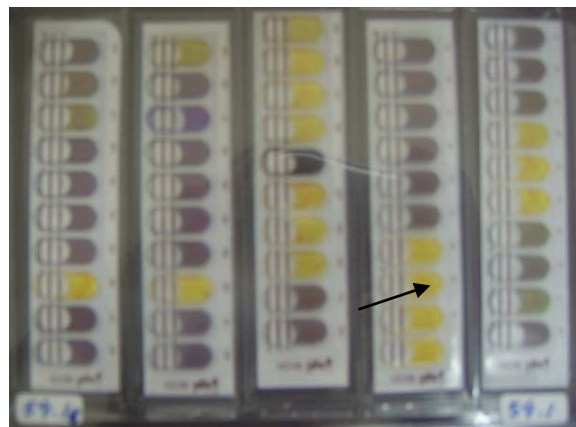
Uji fermentasi dengan menggunakan perangkat kit API 50 CHL menunjukkan bahwa isolat SR21 mampu mendegradasi 18 komponen gula yaitu komponen gula no : 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 39, dan 42 (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil identifikasi isolat SR21 setelah 48 jam pascainokulasi pada perangkat Kit API 50 CHL. Reaksi positif (→)

Dengan memperhatikan tabel pada produk kit API 50 CHL, species BAL yang memiliki kemampuan degradasi gula yang paling mendekati bagi isolat SR21 adalah *Lactococcus lactis spp lactis l*(bioMerieux, Marcy l'Etoile, France, 2006).

Untuk isolat SR54, setelah dilakukan identifikasi dengan menggunakan perangkat kit API 50 CHL, isolat ini berhasil mendegradasi 18 komponen gula yang meliputi gula no : 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 39, dan 42, seperti tersaji pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil identifikasi isolat SR54 setelah 48 jam pascainokulasi pada perangkat Kit API 50 CHL. (tanda panah menunjukkan reaksi positif pada gula No 4)

Dengan memperhatikan tabel pada produk kit API 50 CHL, species BAL yang

memiliki kemampuan degradasi gula yang paling mendekati bagi isolat SR54 adalah *Lactobacillus brevis 1* (bioMeriueux, Marcy l'Etoile, France, 2006).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dari cairan rumen sapi bali dapat diisolasi bakteri asam laktat dengan kemampuan antimikroba yang cukup luas baik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif yakni isolat SR21 (*Lactococcus lactis spp lactis 1*) dan isolat SR54 (*Lactobacillus brevis 1*).

Saran

Berpedoman atas hasil penelitian yang diperoleh maka disarankan perlunya dilakukan kajian yang lebih mendalam dari kedua isolat bakteri penghasil substansi antimikroba secara molekuler melalui analisis DNA sampai ke tahap *sequencing* untuk lebih meyakinkan filogenetik dari isolat yang berhasil diisolasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek Penelitian Hibah Bersaing XV Tahun Anggaran 2007 dengan Kontrak Nomor: 045/SP2H/PP/ DP 2M/III/2007 Tanggal 29 Maret 2007

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 2000. Lactospore. Lactic Acid Bacillus. *Lactobacillus sporogenes*. <http://www.Lactospore.com/ba ck.htm>.2000.
- Bandini Y. 2003. *Sapi Bali*. Penebar Swadaya.
- BioMeriueux, Marcy l'Etoile, France. 2006. Api 50 CHL Medium. BioMeriueux, Inc.
- Brashears MM, Jaroni D, Trimble J. 2003. Isolation, Selection and Characterization of Lactic Acid Bacteria for Competitive Exclusion Product to Reduce Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle. *J Food Protection*. 66 (3): 355-363.
- Garver KI, Muriana PM. 1993. Detection, Identification, and Characterization of Bacteriocin Producing lactic Acid Bacteria from Retail Food Products. *Int J Food Microbiol*. 19: 241-258
- Gaspersz V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan*. Bandung: CV Armico p 472.
- Gorbach., SL. 2001. Microbiology of the Gastrointestinal Tract. <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch095.htm>
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th Ed. Springer Science + Business Media. Inc.
- Nurliana. 1997. Pengaruh Penambahan Bakteriosin dan Gabungan Bakteriosin Produksi Bakteri Asam Laktat terhadap Jumlah Bakteri dalam Susu Pasteurisasi.
- Ray B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a Food Biopreservative, 207-264. In: B. Ray and M. Daeschel (ed). Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press. Boca Raton.
- Salminen S, Wright AV. 1998. Lactic Acid Bacteria: *Microbiology and Functional Aspects*. 2ndEd. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Soeparno. 2005. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Cetakan ke-4 . Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: PT, Gramedia Pustaka. Pp. 168-266.
- Surono IS. 2004. *Probiotik. Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta: YAPMMI.
- Widodo AD. 2003. *Bioteknologi Industri Susu*. Cetakan ke-1. Yogyakarta: Lacticia Press. p 114.
- Wildurdyke MR, Smith DA, Brashears MM. 2004. Isolation, Identification and selection of Lactic Acid Bacteria from Alfalfa Sprouts for Competitive Inhibition of Foodborne Pathogens. *J Food Protection*. 67(3): 947-951.
- Wiryawan KG, Tjakradidja AS, Rarah Ratih AM, Janingrum, E.D. 2003. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba. *J Veteriner*. 4(3): 85-92.