

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Fermented Tembaga Durian (*Durio zibethinus* Murr.) from Padang Pariaman West Sumatra

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) pada Fermentasi Durian Tembaga (*Durio zibethinus* Murr.) dari Padang Pariaman Sumatera Barat

Sharah Iza Fadila¹, Resti Fevria^{1*}, Dezi Handayani¹, Dwi Hilda Putri¹

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: restifevria@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Lactic acid bacteria are a group of bacteria that produce lactic acid as a metabolic product. LAB are Gram-positive bacteria in the form of cocci, rods without spores and are microaerophilic. LAB can be isolated from various fermented food preparations, one of which is tempoyak. Tempoyak is a processed durian fruit product made by anaerobic spontaneous fermentation for 3-7 days. Tempoyak fermentation involves lactic acid bacteria (LAB), a type of bacteria that can produce lactic acid, hydrogen peroxide, antimicrobials and other metabolic products which have a positive influence on food productivity, especially fermented foods. This study aims to determine the amount and characteristics of BAL from fermented durian tembaga. This research is a descriptive research. Isolation and characterization of LAB was carried out using the Total Plate Count (TPC) method using MRSA selective medium. BAL characterization was carried out using microscopic and macroscopic observations using the Gram staining method. Based on the research carried out, 3 LAB isolates were obtained. Macroscopic observations showed that the colonies had a round shape (circular), smooth edges (entire), elevations (convex and raised) and were milky white in color. Microscopic observations showed colonies of Gram-positive bacteria in the form of bacilli cells.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Isolate, Tempoyak, Durian

Abstrak

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang memproduksi asam laktat sebagai produk metabolik. BAL adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus, batang tidak berspora dan bersifat mikroaerofilik. BAL dapat diisolasi dari berbagai olahan pangan fermentasi salah satunya adalah tempoyak. Tempoyak merupakan produk olahan buah durian yang dibuat dengan cara fermentasi spontan secara anaerob selama 3-7 hari. Fermentasi tempoyak melibatkan bakteri asam laktat (BAL) yaitu jenis bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba, dan hasil metabolisme lain yang memberikan pengaruh positif bagi produktivitas makanan terutama makanan fermentasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari fermentasi durian tembaga. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Isolasi dan karakterisasi BAL dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan medium selektif MRSA. Karakterisasi BAL dilakukan dengan pengamatan mikroskopis dan makroskopis dengan metode pewarnaan Gram. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan 3 isolat BAL. Pengamatan makroskopis diperoleh koloni bentuk bulat (circular), tepian licin (*entire*), elevasi (*convex* dan *raised*) dan berwarna putih susu. Pengamatan mikroskopis diperoleh koloni bakteri Gram positif berbentuk sel batang (*bacill*).

Kata kunci : Bakteri Asam Laktat, Isolasi, Tempoyak, Durian

Pendahuluan

Durian (*Durio zibethinus* Murr.) merupakan salah satu jenis buah yang populer di Indonesia, memiliki rasa dan aroma yang khas serta banyak diminati orang banyak (Najira *et al.*, 2020). Durian tembaga merupakan durian lokal unggulan dari Sumatera. Ciri khas dari durian ini adalah warna daging buahnya yang kuning

menyerupai tembaga. Aroma yang kuat dan khas, rasa yang manis dan sedikit pahit, serta kandungan nutrisi yang tinggi merupakan salah satu faktor yang menjadi keunikan dari durian tembaga ini.

Kesulitan dalam penanganan buah durian saat musim panen adalah sifatnya yang mudah busuk, sehingga tidak tahan lama pada suhu ruang. Dalam bentuk utuh, daging buah durian yang telah masak umumnya hanya bertahan selama 4-6 hari (Anggraini dan Widawati, 2015). Fermentasi durian ini dapat mengatasi masalah melimpahnya durian pada masa panen puncak. Pengolahan durian dengan fermentasi menghasilkan produk yang disebut tempoyak (Muzaifa *et al.*, 2018). Tempoyak merupakan makanan hasil fermentasi sebagai upaya pengawetan pangan secara tradisional. Tempoyak mempunyai aroma yang tajam dan rasanya asam dan digolongkan sebagai makanan hasil fermentasi asam laktat (Arifianti, 2017).

Sumatera Barat terkenal dengan berbagai macam makanan tradisional fermentasi salah satunya adalah tempoyak. Umumnya pembuatan tempoyak di masyarakat dilakukan secara tradisional dan sifatnya spontan tanpa penambahan inokulum atau kultur murni (Arifianti, 2017). Makanan tradisional fermentasi memegang peranan penting dalam memenuhi kebutuhan makanan sehari-hari oleh masyarakat karena mengandung protein, karbohidrat, dan vitamin (Aryanta dan Tomita, 2000). Dampak positif dari produk fermentasi terhadap kesehatan konsumen menjadi alasan pengembangan produk fermentasi saat ini. Pemecahan komponen yang kompleks menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana menyebabkan produk fermentasi mudah dicerna dari pada produk pangan asalnya.

Fermentasi tempoyak melibatkan bakteri asam laktat (BAL) yaitu jenis bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba, dan hasil metabolisme lain yang memberikan pengaruh positif bagi produktivitas makanan terutama makanan fermentasi (Nur, 2005). BAL merupakan kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi (Masood *et al.*, 2011). BAL ini bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk coccus atau basil, umumnya bersifat katalase negatif, dan membutuhkan suhu mesofilik (Nudyanto dan Zubaidah, 2015).

BAL merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk batang atau bulat, tidak mempunyai spora, fermentasi anaerob fakultatif, tidak mempunyai sitokrom, tidak mempunyai kemampuan mereduksi nitrat dan memanfaatkan laktat, oksidasi negatif, katalase negatif, motilitas negatif dan kemampuan memfermentasi glukosa menjadi asam laktat (Carr, 2002). Ciri terpenting BAL adalah kemampuannya dalam merombak senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana sehingga dihasilkan asam laktat..

BAL tergolong sebagai salah satu probiotik (Widiyaningsih, 2011). Probiotik menurut FAO/WHO adalah mikroorganisme hidup yang bila pada diberikan dalam jumlah yang cukup memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (Araya *et al.*, 2002) Probiotik adalah segala bentuk preparasi sel mikroba atau komponen sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan inang. Probiotik diperlukan untuk menjaga keseimbangan populasi mikroba dalam saluran pencernaan, dengan cara menekan pertumbuhan berlebih dari patogen. Produk asam menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba patogen seperti *Salmonella* dan *Staphylococcus aureus* yang ditemukan pada sebuah bahan akan terhambat jika terdapat BAL pada bahan tersebut (Mishra, 2007).

Saat ini, beberapa BAL yang telah berhasil diisolasi dari makanan fermentasi antara lain, stroberi (Fevria, 2018), tomat (Fevria, 2019), markisah kuning (Sari, 2013), markisah ungu (Zahro, 2014), sauerkraut dari kubis dengan penambahan cabe rawit (Fevria, 2019), sauerkraut dengan penambahan cabe (Fevria, 2019) dan sauerkraut dari kubis dengan penambahan gula (Fevria, 2020). Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian dengan judul : "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Durian Tembaga (*Durio zibethinus*. Murr) dari Padang Pariaman Sumatera Barat".

Bahan dan Metode

Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus sampai November 2023 di Laboratorium Penelitian Terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini terbagi menjadi dua yaitu alat utama dan alat pendukung. Alat utama terdiri dari erlenmeyer, petridish, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, jarum ose, bunsen, vortex, tip, mikropipet, Drigalski, rak tabung reaksi, hot plate, magnetic stirrer, enkas, autoclave, centrifuge, pinset dan, baki pewarnaan Gram. Sedangkan alat pendukung yang digunakan seperti kamera, batang pengaduk, botol semprot, sendok, spatula, timbangan analitik, spektrofotometer, kuvet, dan neraca analitik. Untuk pengamatan mikroskopis digunakan mikroskop binokuler sedangkan untuk pengamatan secara makroskopis menggunakan mikroskop stereo.

Bahan yang digunakan adalah buah durian tembaga (*Durio zibenthinus* Murr.) yang dibeli didaerah kayu tanam kabupaten Padang Pariaman, media *Mann Ragose Sharpe Agar* (MRSA), aluminium foil, aquades steril, alkohol 70%, plastik wrapping, kain kasa, kapas, dan kertas label.

Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan Sampel (Tempoyak)

Buah durian yang digunakan dalam pembuatan tempoyak adalah durian yang telah matang dengan memilih Durian Tembaga. Biji Durian dipisahkan dari dagingnya yang telah dipisahkan dari biji. Kemudian disimpan didalam wadah tertutup dan difermentasi pada suhu ruang selama 1 minggu. Setelah seminggu tempoyak akan mengeluarkan aroma yang khas, maka tempoyak siap dijadikan sampel untuk mengetahui karakteristik fisik tempoyak serta isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat yang dihasilkan.

b. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat diisolasi menggunakan media selektif. Media yang digunakan untuk isolasi BAL yaitu deMan Rogosa Sharpe Agar (MRSA) (Putri dan Kusdiyantini, 2018). Isolasi BAL dilakukan menggunakan pengenceran bertingkat hingga pengenceran ke-enam (10^{-2} – 10^{-6}). Sebanyak 100 μ L suspensi hasil pengenceran diambil dengan menggunakan mikropipet dan diinokulasi ke permukaan medium MRSA. Inokulum diratakan dengan metode sebar (spread plate) menggunakan drigalski. Pengujian sampel dilakukan secara duplo (dua kali), selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

c. Perhitungan Jumlah Koloni BAL

Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah BAL adalah metode hitung cawan (Total Plate Count). Jumlah koloni yang digunakan untuk menghitung total BAL yaitu dengan skala koloni 30-300 dinyatakan dalam cfu/ml dengan menggunakan rumus: Jumlah sel bakteri = Jumlah koloni x Jumlah faktor pengenceran

d. Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Pengamatan makroskopis dilakukan untuk mengetahui karakteristik morfologi koloni BAL. Pengamatan makroskopis yang dilakukan berupa bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni bakteri. Masing-masing koloni diamati di bawah mikroskop stereo dan difoto untuk dokumentasi.

Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan tahapan pewarnaan Gram. Prosedur pewarnaan Gram dimulai dengan pembuatan apusan masing-masing BAL yang berbeda morfologi yang telah diisolasi dari fermentasi durian, dengan cara satu tetes aquadest steril diteteskan pada bagian tengah kaca objek. Satu ose bakteri dicampurkan dengan aquadest steril tersebut. Apusan bakteri disebarkan secara tipis dan merata pada kaca objek dengan diameter \pm 1 cm. Apusan dibiarkan mengering di udara, selanjutnya difiksasi dengan cara melewatkan di atas api sebanyak 3-4 kali. Apusan ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan selama satu menit. Apusan dicuci dengan air mengalir menggunakan botol pijat. Selanjutnya apusan digenangi kembali dengan lugol dan dibiarkan selama 1 menit. Apusan kembali dicuci dengan air mengalir menggunakan botol pijat. Pewarnaan pada apusan dilunturkan dengan cara mencuci dengan menggunakan alkohol 70% sampai kristal violet tidak ada lagi yang mengalir dari apusan. Selanjutnya, apusan diwarnai dengan pewarnaan safranin selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Langkah terakhir prosedur pewarnaan gram adalah apusan dikeringkan dengan kertas saring. Apusan diamati dibawah mikroskop binokuler (Pelczar & Chan, 2005).

Analisis Data

Data hasil pengamatan berupa karakteristik makroskopis dan mikroskopis meliputi morfologi koloni bakteri (bentuk, tepian, elevasi, dan warna koloni) dan jenis Gram digunakan untuk identifikasi BAL. Hasil pengukuran kerapatan BAL dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

Hasil dan Pembahasan

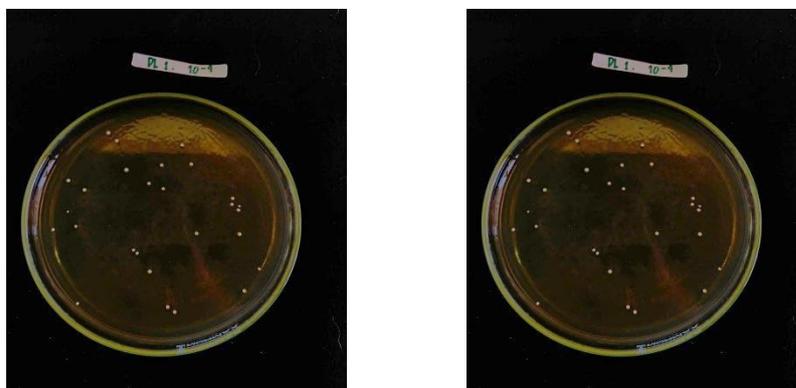
a. Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Dari penelitian yang telah dilakukan yaitu isolasi bakteri asam laktat (BAL) pada fermentasi durian tembaga dari Padang Pariaman Sumatera Barat, yang memperlihatkan adanya koloni berbentuk bulat dan berwarna putih susu. Koloni yang tumbuh setelah proses inkubasi pada suhu 37°C dengan waktu tumbuh rata-rata 40 jam.

Fermentasi tempoyak dibuat secara spontan tanpa penambahan mikroba dari luar (strarter) dan proses fermentasi yang terjadi secara anaerob. Hasil riset terdahulu (Leisner *et al.*, 2001) menyatakan bahwa BAL yang terlibat didalam tempoyak umumnya adalah bakteri yang bersifat heterofermentatif. Bakteri heterofermentatif adalah jenis bakteri yang selain penghasil asam-asam organik juga menghasilkan alkohol dan CO₂.

Bakteri asam laktat diisolasi mampu memproduksi senyawa metabolit sebagai antibakteri. BAL biasanya memproduksi bakteriosin yang merupakan peptida dengan sifat sebagai antibakteri. Selain kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen, bakteriosin tidak membahayakan flora normal usus karena mudah dicerna oleh enzim-enzim pencernaan (Rustan, 2013). Ciri khusus BAL adalah mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, dan garam yang tinggi serta mampu memfermentasi monosakarida dan disakarida (Fevria, 2019). Pertumbuhan koloni BAL yang tumbuh di medium MRSA dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari tempoyak pada pengenceran 10⁴.



b. Perhitungan Jumlah Koloni

Hasil perhitungan jumlah koloni BAL, didapatkan jumlah sel bakteri yaitu sebanyak 30,5 x 10⁴ cfu/mL. Total BAL yang diperoleh 3 isolat yang memiliki karakter morfologi yang berbeda. Hasil karakterisasi secara makroskopis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan Makroskopis BAL Tempoyak.

Sampel Tempoyak	Kode Isolat	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna
DL 1	DL 1 10 ⁴ 1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Putih susu
DL 2	DL 2 10 ⁴ 1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	Putih susu
	DL 2 10 ⁴ 2	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	Putih susu

Karakterisasi mikroskopis BAL dilakukan untuk mengonfirmasi bakteri yang telah diisolasi dan dimurnikan pada medium miring. Pengamatan mikroskopis ini dilakukan untuk melihat bentuk sel dan jenis Gram isolat bakteri. Keterangan masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengamatan Mikroskopis BAL Tempoyak

Sampel	Kode Isolat	Mikroskopis
DL 1	DL1 10 ⁴	Gram : Positif (+) Bentuk : <i>Bacill</i>
DL 2	DL 2 10 ⁴ 1	Gram : Positif (+) Bentuk : <i>Bacill</i>
	DL 2 10 ⁴ 2	Gram : Positif (+) Bentuk : <i>Bacill</i>

Hasil pewarnaan Gram pada keseluruhan isolat bakteri tempoyak adalah Gram positif, yaitu sel bakteri berwarna ungu setelah dilakukan pewarnaan Gram. Hasil uji pewarnaan Gram terhadap isolat menghasilkan isolat yang memiliki bentuk sel batang (*bacill*). Bakteri Gram positif mempunyai ciri-ciri dinding sel dengan peptidoglikan yang lebih tebal sehingga penyerapan warna dari kristal violet yang terserap dalam sel akan bertahan walaupun dilakukan pencucian menggunakan larutan peluntur (alkohol dan lugol) yang dapat melunturkan warna pada kristal violet.

Karakteristik koloni dan pengujian Gram semuanya menunjukkan hasil positif, karena selnya berwarna ungu. Hasil ini didukung oleh pendapat Urnemi *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa salah satu teknik pewarnaan yang paling penting untuk mengidentifikasi bakteri adalah dengan metode Gram atau pewarnaan Gram.

Daftar Pustaka

- Anggraini, L. dan L. Widawati. 2015. Pengaruh Waktu Fermentasi Tempoyak terhadap Sifat Organoleptik Sambal Tempoyak. *Agritepa*. 1(2): 118-127.
- Araya M., 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working 12 group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Arifianti, K. Y. 2017. Peran Pendidikan dan Pengetahuan Ilmu Kimia dalam Mengembangkan Potensi Pengawetan (Tempoyak atau Pakasam) Bahan Nabati dan Hewani Lokal Daerah Kalimantan Tengah. *Jurnal Ilmiah Kanderang Tinggang*. 8(1) : 1-7.
- Aryanta, & Tomita, F., 2000, Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of "urutan", a Balinese indigenous fermented sausage. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, pp. 255-262.
- Carr, FJ, D. Dinginkan, dan N. Maida. 2002. *Bakteri Asam Laktat: Survei Literatur*. Kritik Rev. Mikrobiol.
- Fevria R, Hartanto I. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus* sp.) dari tomat. *Jurnal UNP Bioscience*.
- Fevria R, Hartanto I. 2019. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (Lactobacillus sp.) dari Tanaman Strawberry*. Prosiding Seminar Internasional Icomset.
- Fevria, R. Hartanto, I. 2019. Isolation and Characterization of Lactid Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) from Sauerkraut with the Addition of Cayenne Pepper. *Bioscience*, Vol 3(2): 169-175.
- Fevria, R. Hartanto, I. 2018. Isolation dan Characterization of Lactid Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) from Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Bioscience*, Vol. 2(2): 45-49.
- Fevria, R. Hartanto, I. 2020. Isolation and Characterization of Lactid Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) from Saurkraut with the Addition of Sugar. *Global Conferences Series:Sciences and Tecnology (GCSST)*, Vol. 4:19-23.
- Masood MI, Qadir MI, Shirazi JH, Khan IU. 2011. Benefical Effect Of LacticAcid Bacteria On Human Beings. *Critical Reviews In Miicrobiology*. 37(1): 91-98.
- Mishra, SK, Sangwan N.S dan Sangwan RS. 2007. Andrographis (Burm. F) Nees (Kalmegh) : Ulasan. *Tinjauan Farmakognosi*. Jil. 1, Edisi 2, Juli-Des 2007.

- Najira, N., Selviyanti, E., Tobing, Y. B., Kasmawati, K., Sianturi, R., & Suwardi, A. B. 2020. Diversitas Kultivar tanaman Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Ditinjau dari Karakter Morfologi. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(2), 185-193.
- Nudyanto A, Zubaidah E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakaria Dari Kimchi. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri* 3(2):743-748.
- Nur, Hasrul S. 2005. Pembentukan Asam Organik Oleh Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibenthisnus*. Murr.). *Jurnal bioscientiae*. Vol.2, No.1:15-24.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S., 2005, "*Dasar-dasar Mikrobiologi 1*", Alih bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S. dan Angka, S.L., UI Press, Jakarta.
- Sari, Yuni,. 2014. *Isolasi dan Identifikasi BAL hasil Fermentasi Markisa Ungu sebagai Penghasil Eksopolisakarida*. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Widiyaningsih, E.N. 2011. Peran Probiotik Untuk Kesehatan. *Jurnal Kcesehatan*. 4(1): 14-20.