

# SIFAT ANTAGONISTIK *Lactobacillus* sp B441 DAN II442 ASAL TEMPOYAK TERHADAP *Staphylococcus aureus*

Antagonism of *Lactobacillus* sp B441 and II442 from Tempoyak against *Staphylococcus aureus*

Tri Wardani Widowati, Basuni Hamzah, Agus Wijaya, Rindit Pambayun

Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Palembang - Prabumulih Km. 32 Inderalaya, Kabupaten Ogan Ilir, Propinsi Sumatera Selatan 30662  
Email: triwardaniwidowati@yahoo.com

## ABSTRAK

*Lactobacillus* sp B441 dan II442 merupakan spesies bakteri asam laktat yang diisolasi dari tempoyak yaitu makanan fermentasi dari daging buah durian. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri patogenik yang habitat alaminya pada permukaan kulit manusia dan membran mukosa seperti hidung. Proses fermentasi tempoyak khususnya saat pemisahan daging buah durian dari bijinya beresiko terkontaminasi oleh *Staphylococcus aureus*. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji sifat antagonistik dari *Lactobacillus* sp B441 and II442 yang diisolasi dari tempoyak terhadap *Staphylococcus aureus*. Identifikasi secara fenotif menggunakan API 50 CHL test kit menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat tersebut adalah *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442. Berdasar uji *co-culture* diketahui bahwa kedua spesies tersebut mempunyai efek bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pada jam ke 25 *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara *mix-culture* dengan *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442 asal tempoyak turun 3 – 4 *log cycle* dari populasi awal. Sedangkan populasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *mono-culture* meningkat sekitar 2 *log cycle* pada jam ke 25.

**Kata kunci:** *Lactobacillus* sp, tempoyak, antagonistik, *Staphylococcus aureus*

## ABSTRACT

*Lactobacillus* sp B441 and II442 were species of lactic acid bacteria isolated from tempoyak, a kind of food fermented made from durian flesh. *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacteria that has natural habitat on the surface of human body such as on the skin and in mucous membranes like the nose. Contamination of *Staphylococcus aureus* was a risk factor in tempoyak fermentation, especially, during taking the durian flesh from seeds. The aim of this research was to observe antagonistic property of *Lactobacillus* sp B441 and II442 isolated from tempoyak during low temperature fermentation against *Staphylococcus aureus*. Phenotypic identification using API 50 CHL test kit indicated that isolates were *Lactobacillus plantarum* B441 and *Lactobacillus plantarum* II442. Based on *co-culture* analysis show that isolates of *Lactobacillus plantarum* B441 and II442 have bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 as a indicator of pathogenic bacteria. At 25<sup>th</sup> hours, population of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in *mix-culture* with *Lactobacillus plantarum* B441 and *Lactobacillus plantarum* II442 decreased 3 – 4 *log cycle* from initial population. However, population of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in *mono-culture* increased 2 *log cycles* at 25<sup>th</sup> hours.

**Keywords:** *Lactobacillus* sp, tempoyak, antagonism, *Staphylococcus aureus*

## PENDAHULUAN

*Lactobacillus* sp merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang banyak terlibat dalam pangan hasil fermentasi terutama yang melibatkan proses fermentasi spontan seperti bekasam, sawi asin, *sourkraut*, dan tempoyak. Bakteri asam laktat, termasuk *Lactobacillus* sp., diketahui aman digunakan

dalam proses fermentasi pangan. Secara umum, bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* mempunyai karakteristik Gram positif, katalase negatif, *acid-tolerant*, nonspora, kandungan G + C rendah, bentuk sel *rods* atau *coccobacilli*, aero-toleran atau anaerobic, *fastidious* dan mampu menghasilkan asam laktat dari substrat glukosa (Claesson,dkk, 2007). Ditinjau dari kemampuan fermentasinya, genus *Lactobacillus* dibagi menjadi

tiga golongan yaitu obligat homofermentatif (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*), fakultatif heterofermentatif (*L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*) dan obligat heterofermentatif (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*) (Hammes dan Vogel, 1995).

Selain terlibat dalam proses fermentasi pangan, bakteri asam laktat (termasuk *Lactobacillus* sp.) banyak dimanfaatkan dalam proses pengawetan pangan. Kemampuan bakteri asam laktat dalam pengawetan pangan terjadi karena bakteri tersebut menghasilkan berbagai metabolit yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan. Metabolit tersebut antara lain asam organik, hidrogen peroksida, alkohol, dan komponen antimikrobia seperti bakteriosin (Daeschel, 1989). Masing-masing komponen metabolit mempunyai mekanisme tertentu dalam menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan.

Berbagai publikasi penelitian tentang aktivitas antagonistik bakteri asam laktat dan metabolitnya terhadap pertumbuhan bakteri patogenik telah banyak dilakukan. Penelitian Usmiati dkk. (2009) menjelaskan bahwa bakteriosin asal *Lactobacillus* sp 1223 SCG yang diisolasi dari susu sapi segar bersifat aktif baik pada suhu kamar (27°C) dan suhu rendah (4°C). Bakteriosin tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogenik pada daging segar seperti *Salmonella thypimurium* dan *Escherichia coli*. Efektifitas bakteriosin dari *Lactobacillus* sp 1223 SCG terhadap *Listeria monocytogenes*, hampir menyamai efektifitas nisin. Salih dkk. (2011) menjelaskan bahwa supernatan bebas sel bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu fermentasi asal Sudan, 'Rob', mengandung komponen antimikrobia yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogenik seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia*. Pertumbuhan bakteri coliform dan *Staphylococcus aureus* dalam daging ikan sarden giling dapat dikurangi dengan menginokulasikan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Ndaw dkk., 2008). Selain itu Gan dkk. (2002) menjelaskan bahwa *Lactobacillus fermentum* RC-14 dan biosurfaktan yang disekresikan mampu menghambat infeksi *Staphylococcus aureus*. Peneliti lain, Klayraung dan Okonogi (2009) menerangkan bahwa *Lactobacillus fermentum* FTL2311 dan FTL10BR yang diisolasi dari "miang" mempunyai kemampuan antibakteri terhadap bakteri patogenik seperti *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DMST 6512 (ATCC 6538Ptm). Antibakteri tersebut menyebabkan kerusakan struktur membran sel yang berujung pada pengkerutan dan keretakan sel.

*Staphylococcus aureus* adalah jenis bakteri patogenik Gram positif yang salah satu habitat alaminya yaitu permukaan kulit tubuh manusia dan membran mukosa seperti mukosa hidung. Jenis bakteri ini merupakan penyebab infeksi terbesar pada manusia (Gan dkk., 2002). Bakteri jenis ini dapat mengkontaminasi pada bahan pangan lewat kontak

secara langsung atau tidak dengan kulit manusia atau saluran pernafasan. Tempoyak sangat beresiko terkontaminasi oleh *Staphylococcus aureus*, karena pada proses pembuatannya banyak terjadi kontak langsung dengan tangan dan permukaan kulit manusia terutama saat pemisahan daging buah durian. Hal ini yang menjadikan alasan pemilihan *Staphylococcus aureus* sebagai mikrobia patogenik indikator

Pada penelitian sebelumnya telah diisolasi bakteri asam laktat asal tempoyak yang difermentasi pada suhu  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Diketahui bahwa tempoyak merupakan produk fermentasi tradisional yang proses fermentasinya terjadi secara spontan yang hanya mengandalkan garam sebagai penyeleksi mikrobia yang tumbuh, karbohidrat sebagai substrat, dan kondisi fermentasi fakultatif anaerob sampai mikroaerofilik, sehingga keberadaan bakteri asam laktat dalam tempoyak sangat tinggi. Isolat bakteri asam laktat asal tempoyak yang diperoleh mempunyai karakteristik menghasilkan asam, katalase negatif, Gram positif, tidak motil, bentuk sel batang pendek dan tidak tumbuh pada kadar garam 18 %, sehingga diidentifikasi sebagai *Lactobacillus* sp. B441 dan *Lactobacillus* sp. II442. Seperti halnya produk fermentasi tradisional lainnya, pelepasan biji dari daging buah durian pada pembuatan tempoyak dilakukan dengan tangan secara langsung, sehingga tempoyak sangat beresiko terkontaminasi oleh *Staphylococcus aureus*.

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan diidentifikasi dan dievaluasi aktivitas antagonistik isolate *Lactobacillus* sp. B441 dan *Lactobacillus* sp. II442 asal tempoyak yang difermentasi pada suhu  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa isolat *Lactobacillus* sp. B441 dan *Lactobacillus* sp. II442 asal tempoyak yang difermentasi pada suhu  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Mikrobia patogenik indikator yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan, Palembang. Sedangkan media yang dipakai pada penelitian ini adalah Pronadisa 1215 MRS (deMann Rogosa Shrape) broth dari Agarindo Biological Laboratory untuk propagasi bakteri asam laktat. Media Nutrient Broth dari Oxoid untuk peremajaan awal bakteri *Staphylococcus aureus*. Media Baird Parker Agar Base dari e-Merck dan suplemen Egg Yolk Tellurite dari Oxoid merupakan media selektif untuk penghitungan populasi bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses identifikasi isolat bakteri asam laktat dilakukan secara fenotipik menggunakan API 50 CHL test kit dari Biomerieux, Perancis.

Alat yang dipakai antara lain autoclave, *laminar flow cabinet*, vorteks, mikropipet, lemari pendingin, *waterbath*, neraca, serta peralatan gelas yang digunakan untuk analisis mikrobiologis.

### Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat

Isolat merupakan bakteri asam laktat apabila menghasilkan asam, Gram positif, katalase negatif, dan berbentuk bulat atau batang pendek. Selanjutnya dilakukan identifikasi awal untuk menentukan genusnya, yaitu dengan cara menguji kemampuannya menghasilkan CO<sub>2</sub> dari glukosa, tumbuh pada berbagai suhu, pH serta kadar garam. Proses identifikasi sampai pada tingkat spesies ini dilakukan secara fenotif menggunakan standart kit mikrobiologi berupa API (Analytical Profile Index) 50 CHL. Standart kit mikrobiologi API 50 CHL ini digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dan genus lain yang berdekatan. Pada uji ini melibatkan 49 macam reaksi biokimiawi untuk mengetahui kemampuan metabolisme isolat bakteri asam laktat pada berbagai jenis karbohidrat.

Isolat murni bakteri asam laktat yang akan diidentifikasi disiapkan dalam agar miring media MRS agar. Isolat tersebut kemudian diencerkan dengan 2 ml larutan garam 0,85 %, yang selanjutnya disebut sebagai inokulum. Larutan garam 0,85% sebanyak 5 ml disiapkan dan diinokulasi dengan N ml inokulum bakteri asam laktat tersebut sampai mendapatkan tingkat kekeruhan sesuai dengan Mc Farland skala 2 atau setara dengan absorbansi 0,32 – 0,40 pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 625 nm (Ardyati dkk., 2012). Inokulum bakteri asam laktat sebanyak dua kali N ml dimasukkan ke dalam 10 ml API 50 CH medium. Selanjutnya medium tersebut siap dimasukkan ke dalam ke 50 mikrotube yang sudah berisi berbagai jenis karbohidrat, seperti yang dijelaskan pada manual. Setelah medium tersebut dimasukkan dalam mikrotube, lalu masing-masing ditutup dengan minyak mineral dan diinkubasikan pada suhu 30±2°C selama 24 dan 48 jam (±6 jam). Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada masing-masing mikrotube. Hasil positif jika terjadi perubahan warna merah keunguan (*purple*) menjadi kuning, kecuali pada nomor 25 yang memberikan perubahan warna menjadi hitam. Hasil kemudian ditabulasi dan dicocokkan dengan tabel spesies yang ada pada manual.

### Uji Kemampuan Antagonistik Bakteri Asam Laktat

Kemampuan antagonistik bakteri asam laktat ini terhadap bakteri indikator diamati dengan uji *co-culture*. Metode *co-culture* yang digunakan mengacu pada Alomar dkk. (2008) yang dimodifikasi. Pada uji *co-culture* tersebut, spesies bakteri asam laktat (*Lactobacillus* sp. B441 dan *Lactobacillus* sp. II442) ditumbuhkan bersama-sama (*mix-culture*) dengan

bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dalam media MRS broth. Secara periodik pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dalam *mix culture* dihitung dan kemudian dibandingkan dengan pertumbuhannya dalam mono kultur (dalam MRS broth).

Isolat bakteri asam laktat yang akan dianalisis ditumbuhkan dalam media MRS broth dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30±2°C. Setelah diremajakan dalam media nutrient broth, bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai indikator diadaptasikan terlebih dahulu dalam media MRS broth, sebelum digunakan dalam uji *co-culture*. Inkubasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan selama 24 jam pada suhu 30±2°C.

Uji *co-culture* dilakukan dengan menyiapkan 6 tabung reaksi yang berisi 5 ml media MRS broth steril, kemudian kedalamnya diinokulasikan 1% spesies bakteri asam laktat yang diuji dan 1% bakteri indikator patogenik. Selanjutnya, *mix-culture* tersebut diinkubasikan pada suhu 30±2°C selama 25 jam. Secara periodik setiap 5 jam dilakukan penghitungan populasi *Staphylococcus aureus* menggunakan media selektif egg yolk tellurite baird parker agar. Keberadaan *Staphylococcus aureus* ditunjukkan dengan koloni hitam mengkilat. Sebagai pembanding dilakukan juga penghitungan secara periodik setiap 5 jam populasi bakteri *Staphylococcus aureus* secara mono kultur.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Hasil uji fenotipik menggunakan API 50 CHL kit test ini dapat mengidentifikasi isolat bakteri asam laktat sampai ke tingkat spesies. Meskipun uji fenotif ini memberikan keakuratan hasil identifikasi yang lebih rendah bila dibandingkan dengan uji genotip, tetapi dengan melibatkan reaksi biokimiawi yang banyak, maka dapat mengurangi kesalahan dalam identifikasi. Penggunaan API 50 CHL test kit mampu mengidentifikasi secara fenotif spesies bakteri asam laktat dengan benar sampai sekitar 80% (Manual API 50 CHL test kit). Metode identifikasi secara fenotif merupakan resultan dari sifat genetik dan faktor lingkungan sehingga memungkinkan hasil identifikasi yang tidak stabil. Hal ini wajar karena suatu spesies secara fenotipik harus fleksibel agar dapat bertahan hidup pada lingkungan yang bervariasi. Meskipun demikian metoda identifikasi secara fenotif masih memberikan hasil yang relevan. Salah satu usaha yang dapat dilakukan adalah melakukan identifikasi secara fenotif pada kondisi optimumnya.

Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri asam laktat (B441 dan II442) berbentuk batang, dan terbagi

menjadi 2 (dua) yaitu yang bersifat heterofermentatif dan homofermentatif. Isolat *Lactobacillus* sp. tersebut tidak mampu tumbuh pada suhu 45°C. Mengacu pada Axelsson (1998), pengamatan terhadap karakteristik fenotif tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diuji termasuk dalam genus *Lactobacillus*. Keberadaan genus *Lactobacillus* dalam tempoyak ini sangat besar kemungkinannya, mengingat dalam prosesnya tempoyak difermentasi secara spontan dan hanya mengandalkan garam sebagai pengendali pertumbuhan mikrobial. Secara umum, bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* mempunyai karakteristik Gram positif, katalase negatif, acid-toleran, nonspora, kandungan G + C rendah, bentuk sel *rods* atau coccobacilli, aero-toleran atau anaerobik dan *fastidious* (Claesson dkk., 2007). Beberapa *Lactobacillus* tidak memerlukan besi untuk pertumbuhan dan memiliki toleransi hidrogen peroksida yang sangat tinggi. Berdasar kemampuan fermentasinya, genus *Lactobacillus* dibagi menjadi tiga golongan yaitu obligat homofermentatif (*Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*), fakultatif heterofermentatif (*Lactobacillus casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*) dan obligat heterofermentatif (*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*) (Hammes dan Vogel, 1995). Penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa dalam tempoyak dapat diisolasi berbagai spesies *Lactobacillus* sp. antara lain *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *L. corynebacterium*, *L. brevis*, *L. mali*, *L. fermentum*, *L. casei*, (Issa, 2000; Wirawati, 2002; Yuliana dan Garcia, 2009).

Selanjutnya *Lactobacillus* sp. asal tempoyak yang sudah berhasil diidentifikasi awal kemudian diobservasi sampai ke tingkat spesies dengan mengamati kemampuan metabolismenya terhadap berbagai jenis karbohidrat. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2. Kedua isolat baik *Lactobacillus* sp. B441 maupun *Lactobacillus* sp. II442 mempunyai pola metabolisme yang sama terhadap berbagai jenis karbohidrat. Pada uji menggunakan API 50 CHL, isolat tersebut memberikan hasil positif pada 25 jenis gula. Perbandingan dengan tabel identifikasi menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut dapat diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Pada tabel identifikasi menunjukkan bahwa untuk spesies *Lactobacillus plantarum* minimal harus memberikan

hasil positif (75 - 100%) pada 11 jenis karbohidrat yaitu D-Ribosa, D-Galactose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Manose, D-Manitol, N-Acetyl Glucosamine, Amygdalin, D-Maltose, D-Lactose, Gentiobiose. Sedang ke 14 jenis karbohidrat lainnya memberikan hasil positif dengan nilai yang lebih rendah yaitu 1 - 67 %. Identifikasi tersebut didukung oleh Oupathumpanont dkk. (2009), Djossou, dkk. (2011), Yuliana dan Dizon (2011), Desniar dkk. (2012), Wikandari dkk. (2012), Santoso dkk. (2013), Sofyan dkk. (2011) bahwa setidaknya ada 23-26 jenis gula yang memberikan hasil positif pada uji fenotipik menggunakan API 50CHL test kit. Bakteri asam laktat teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* jika memberikan hasil positif pada glukonat dan L-arabinosa, tetapi memberikan hasil negatif untuk xylosa (Yuliana dan Dizon, 2011). *Lactobacillus plantarum* secara umum mampu memfermentasi arabinosa, laktosa, raffinosa, ribosa, sukrosa, threhalosa, cellobiosa, melibiosa dan maltose (Ali, 2011). Djossou dkk. (2011) melaporkan bahwa *Lactobacillus plantarum* memberikan hasil positif pada gentiobiosa. Kadere dan Kutima (2012) menjelaskan bahwa *Lactobacillus plantarum* mampu memfermentasi raffinosa, D-gentiobiose, lactose dan melibiose, tetapi tidak terhadap inulin.

Identifikasi secara fenotif terhadap kedua isolat *Lactobacillus* sp. asal tempoyak menunjukkan bahwa keduanya teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442. Padahal pada identifikasi awal menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. B441 bersifat heterofermentatif (CO<sub>2</sub> pos) dan *Lactobacillus* sp. II442 bersifat homofermentatif (CO<sub>2</sub> neg) (Tabel 1). Claesson dkk. (2007) menyatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* tergolong fakultatif heterofermentatif. Pada bakteri asam laktat jenis ini mempunyai 2 (dua) jalur utama dalam memetabolisme glukosa yaitu jalur aldolase dan phosphoketolase, sehingga kedua jenis enzim tersebut tersedia melimpah dalam sel bakteri asam laktat. Pengaktifan kedua enzim tersebut sangat tergantung pada substrat dan kondisi fermentasi yang digunakan. Tetapi secara umum enzim aldolase relatif lebih aktif dari pada enzim ketolase. Sehingga pada kondisi normal (*limited access to oxygen*) dan adanya substrat glukosa, metabolisme secara homofermentatif menjadi lebih dominan. Hal ini mengakibatkan pada metabolisme glukosa oleh *Lactobacillus plantarum* tidak dihasilkan karbondioksida.

Tabel 1. Karakteristik fenotipik isolat bakteri asam laktat asal tempoyak

No	Isolat	Gram	Katalase	Bentuk sel	Konfigurasi sel	Asam	CO <sub>2</sub>	Suhu (°C)			NaCl (%)		pH		Dugaan Genus
								10	30	45	6,5	18	4,4	6,5	
1	B441	+	-	batang	1,2 rantai	+	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>
2	II442	+	-	batang	1,2 rantai	+	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>
3	Ref	+	-	batang		+	±	±		±	±	-	±		Axelsson (1998)

Tabel 2. Hasil uji fermentatif isolat *Lactobacillus* sp. asal tempoyak dengan API 50 CHL

Jenis gula	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*
L-Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glukose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fruktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl- $\alpha$ D Mannopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Methyl- $\alpha$ D-Glucoopyranoside	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
N-Acetylglucosamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose (bovin origin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Arabitol	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
K-Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Keterangan : 1\*) *Lactobacillus* sp. B441  
 2\*) *Lactobacillus* sp. II442  
 3\*) *Lactobacillus plantarum* (Santoso dkk., 2013)  
 4\*) *Lactobacillus plantarum* (Djossou dkk., 2011)  
 5\*) *Lactobacillus plantarum* (Wikandari dkk., 2012)  
 6\*) *Lactobacillus plantarum* (Kadere dan Kutima, 2012)  
 7\*) *Lactobacillus plantarum* (Yuliana dan Dizon, 2011)  
 8\*) *Lactobacillus plantarum* (Desniar dkk., 2012)  
 9\*) *Lactobacillus plantarum* (Sofyan dkk., 2011)  
 10\*) *Lactobacillus plantarum* (Oupathumpanont dkk., 2009)

Fermentasi secara heterofermentatif akan terjadi terutama jika kondisi fermentasi diatur sehingga tersedia *acceptor* elektron baik internal (NADH) maupun eksternal (O<sub>2</sub>) yang cukup (Axelsson, 1998). Secara umum bakteri asam

laktat heterofermentatif menghasilkan metabolit yang lebih bervariasi antara lain asam laktat, asam asetat, asam propionat, hydrogen peroksida, alkohol, CO<sub>2</sub>, dan bakteriosin (Daeschel, 1989; Axelsson, 1998).

Keberadaan *Lactobacillus plantarum* dalam tempoyak ini sangat besar kemungkinannya. Hal ini mengingat tempoyak difermentasi secara spontan hanya mengandung garam sebagai pengendali pertumbuhan mikrobia, adanya substrat glukosa, kondisi fermentasi yang mikroaerofilik sampai anaerobik serta pH akhir fermentasi antara 4,1–4,15 sehingga memungkinkan tumbuhnya *Lactobacillus plantarum* selama fermentasi tempoyak. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa dalam tempoyak dapat diisolasi spesies *Lactobacillus plantarum* (Leisner dkk., 2001; Rahayu, 2003; Yuliana dan Dizon, 2011).

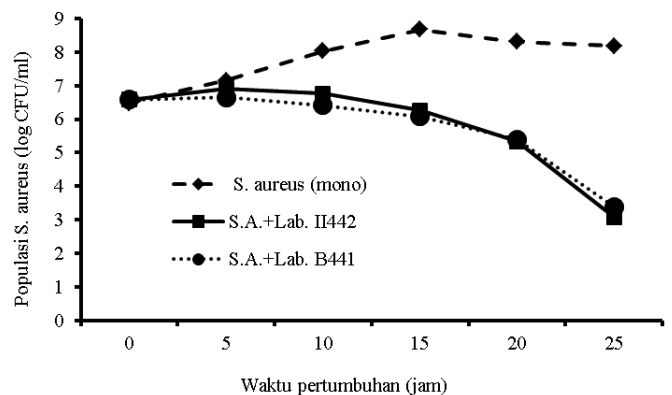
**Aktivitas Antagonistik terhadap *Staphylococcus aureus***

Aktivitas antagonistik isolat bakteri asam laktat terhadap pertumbuhan bakteri indikator *Staphylococcus aureus* dievaluasi menggunakan uji *co-culture*. Adanya aktivitas antagonistik dari isolat bakteri asam laktat akan menyebabkan penurunan kemampuan tumbuh dari bakteri indikator. Kemampuan *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442 asal tempoyak menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa pada *mix-culture* dengan *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442, populasi *Staphylococcus aureus* mengalami penurunan sebanyak 3 log cycle dari populasi awal. Pada 5 jam pertama belum terlihat adanya perubahan populasi *Staphylococcus aureus*. Setelah 10 jam pertama, terlihat *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara mono kultur sudah mengalami peningkatan populasi sekitar 1 log cycle, sedangkan *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara *mix-culture* dengan isolat *Lactobacillus plantarum* B441 atau *Lactobacillus plantarum* II442 asal tempoyak terlihat mulai mengalami penurunan. Pada jam ke 25 *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara *mix-culture* dengan isolat *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442 asal tempoyak turun 3 – 4 log cycle dari populasi awal, yaitu dari populasi  $4,0 \cdot 10^6$  CFU/ml pada jam ke 0 turun menjadi  $1,5 \cdot 10^3$  CFU/ml pada jam ke 25. Sedangkan *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara mono kultur pada jam ke 25 populasinya sudah mencapai  $1,3 \cdot 10^8$  CFU/ml.

Gambar 1 juga mengindikasikan bahwa kedua isolat baik *Lactobacillus plantarum* B441 maupun II442 mempunyai efek bakterisidal terhadap *Staphylococcus aureus*. Gambar 2 dan 3 menunjukkan hasil plating *Staphylococcus aureus* selama pertumbuhan secara *mix-culture* dengan *Lactobacillus plantarum* II442 dan B441 serta kondisi fermentasinya. Selama fermentasi, medium *mix culture* dalam tabung terlihat semakin keruh. Padahal populasi *Staphylococcus aureus* jelas mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa populasi

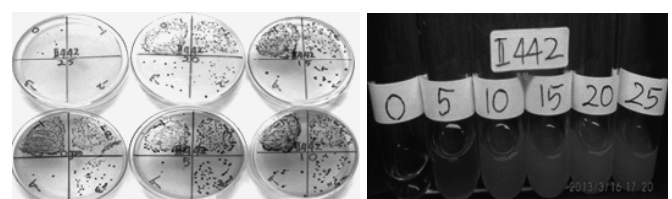
*Lactobacillus plantarum* II442 dan B441 dalam *mix-culture* semakin meningkat seiring dengan meningkatnya waktu fermentasi. Setelah dilakukan penghitungan ternyata populasi *Lactobacillus plantarum* II442 dan B441 diakhir fermentasi (jam ke 25) sekitar  $10^9$ . Hal inilah yang member alasan bahwa *Lactobacillus plantarum* II442 dan B441 mempunyai efek bakterisidal terhadap *Staphylococcus aureus*.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan dan tanpa *L. plantarum*

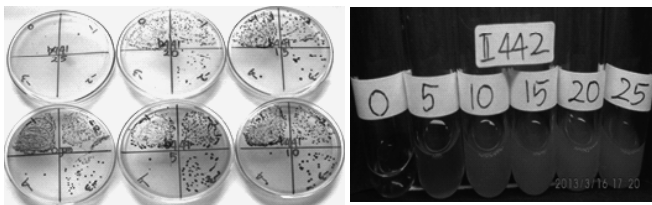
Efek bakterisidal tersebut disebabkan karena beberapa metabolit yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*. Berdasar identifikasi fenotipik menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* II442 dan B441 tergolong bakteri asam laktat heterofermentatif yang menghasilkan beberapa metabolit antara lain hidrogen peroksida, karbondioksida, alkohol, asam laktat, asam asetat, dan bakteriosin. Masing-masing metabolit yang dihasilkan mempunyai aktivitas antimikrobia yang spesifik terhadap bakteri-bakteri kontaminan.

Efek bakterisidal dari hidrogen peroksida karena senyawa tersebut bersifat oksidator kuat pada dinding sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan seperti protein sel dan protein enzim (Zalán dkk., 2005; Finnegan dkk., 2010). Meskipun demikian *Staphylococcus aureus* diketahui bersifat katalase positif (Harris dkk., 2002) yang mempunyai kemampuan menghasilkan enzim katalase dan mampu memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Sehingga efek antimikrobia dari hidrogen peroksida yang



Gambar 2. Plating *Staphylococcus aureus* selama proses pengujian *co-culture* dengan *Lactobacillus plantarum* II442

dihasilkan oleh bakteri asam laktat menjadi hilang dengan keberadaan *Staphylococcus aureus*.



Gambar 3. Plating *Staphylococcus aureus* selama proses pengujian co-culture dengan *Lactobacillus plantarum* B441

Sedangkan mekanisme inaktivasi bakteri karena keberadaan CO<sub>2</sub> masih belum dapat dijelaskan secara detail. Tetapi beberapa peneliti menyatakan bahwa efek antimikrobia dari CO<sub>2</sub> disebabkan karena kemampuan CO<sub>2</sub> menurunkan pH, merubah kondisi menjadi anaerob dan menghambat aktivitas enzim dekarboksilasi (Gill dan Tan, 1980; Teixeira De Mattos dkk., 1984). *Staphylococcus aureus* diketahui bersifat fakultatif anaerob (Harris dkk., 2002) sehingga mampu tumbuh baik pada kondisi anaerobik maupun aerobik. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan karbondioksida tidak mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Efek antibakteri dari senyawa alkohol terjadi karena kemampuan alkohol mendenaturasi protein baik protein dinding sel maupun protein enzim. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan membran sel, sitoplasma serta penghambatan aktifitas beberapa enzim (Lambert, 2004). Alkohol dengan konsentrasi 70% mempunyai kemampuan yang tinggi dalam menginaktivasi bakteri. Diketahui bahwa konsentrasi alkohol dalam metabolit bakteri asam laktat cukup rendah. Hal ini disebabkan alkohol bukan merupakan metabolit dominan dari bakteri asam laktat, sehingga alkohol bukan metabolit yang bertanggung jawab dalam proses inaktivasi *Staphylococcus aureus*.

Asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan karena kemampuannya menurunkan pH (Lambert, 2004). *Staphylococcus aureus* meskipun mempunyai optimum pH 6-7, tetapi range pH pertumbuhannya sangat luas yaitu berkisar antara 4-10 (Valero dkk., 2009). Artinya pada sekitar pH 4,0 yang merupakan pH minimum *Staphylococcus aureus* masih dimungkinkannya untuk bertahan hidup. Diketahui bahwa pada akhir fermentasi *Lactobacillus plantarum* mencapai range nilai pH sekitar 4,0. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan pH medium akibat adanya metabolit asam laktat dan asam asetat yang dihasilkan selama pertumbuhan bakteri asam laktat kurang efektif dalam menginaktivasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Selain itu *Lactobacillus plantarum* juga menghasilkan senyawa protein antimikrobia (bakteriosin) yaitu plantaricin

yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan (Anas dkk., 2008; Héquet dkk., 2007; Lonkar dkk., 2005; Nikolova dkk., 2009; Todorov dkk., 2007). Sehingga senyawa inilah yang diduga bertanggung jawab pada proses inaktivasi *Staphylococcus aureus*. Todorov dkk. (2007) menjelaskan bahwa bacteriocin mempunyai efek bakterisidal terhadap bakteri kontaminan dengan cara mempengaruhi stabilitas dinding sel dan menyebabkan kebocoran membrane sel dan sitoplasma. Klayraun dan Okonogi (2009) menerangkan bahwa pada *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DMST 6512 (ATCC 6538Ptm) adanya pengkerutan yang tidak normal pada selnya setelah diperlakukan dengan supernatan dari *Lactobacillus fermentum* FTL2311 dan *Lactobacillus fermentum* FTL10BR. Bentuk morfologi sel yang tidak normal dapat menyebabkan lisis dan keluarnya komponen-komponen sel sehingga sel bakteri indikator menjadi tidak aktif (Klayraung dan Okonogi, 2009).

## KESIMPULAN

Identifikasi secara fenotif menggunakan API 50 CHL test kit menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat tersebut adalah *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442. Berdasar uji co-culture diketahui bahwa kedua spesies tersebut mempunyai efek bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pada jam ke 25 *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan secara mix-culture dengan isolat *Lactobacillus plantarum* B441 dan *Lactobacillus plantarum* II442 asal tempoyak turun 3 – 4 log cycle dari populasi awal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A.A. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk in Khartoum State, Sudan. *International Journal of Dairy Science* **6**(1): 66-71.
- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S. dan Montel, M.C. (2008). Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behavior of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology* **25**: 502-508.
- Anas, M., Eddine, H.J. dan Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian Raw Goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Science* **3**(2): 39-49.
- Ardyati, T., Sjöfyán, O., Kartikasari, N., P. dan Tizar A. (2011). Identification of lactic acid bacteria from quail (*Coturnix Japonica*) tractus digestivus and their potency to inhibit growth of *Salmonella typhimurium*. *Proceeding The*

3<sup>rd</sup> International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3<sup>rd</sup>IC-ISLAB).

- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Dalam: Salminen, S. Dan von Wright, A. (ed.). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Hal. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York.
- Claesson, M.J., van Denyer, D. dan O'Toole, P.W. (2007). The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Letters* **269**(1): 22-28.
- Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* **43**(1): 164-167.
- Desniar, Rusmana, I., Suwanto, A., dan Mubarik, N.R. (2012). Senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat asal bekasam. *Jurnal Akuatika* **III**(2): 135-145.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F.L., Rodriguez-Serrano, G. Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A. dan Roussos, S. (2013). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerob* **17**(2011): 267-272.
- Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. dan Maillard, J.Y. (2010). Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agent: differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 2108-2115.
- Gan, B.S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P. dan Howard, J.C. (2002). *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rat. *The Journal of Infectious Diseases* **185**: 1369-1372.
- Gill, C.O. dan Tan, K.H. (1980). Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* **39**(2): 317-319.
- Hammes, W.P. dan Vogel, R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. *Dalam: Wood, B.J.B. dan Holzapfel, W.H (ed). The Genera of Lactic Acid Bacteria*, hal 19-44. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Harris, L.G., Foster, S.J. dan Richards, R.G. (2002). An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials* **4**: 39-60.
- Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., Sousa-Caetano, D.D., Thomas, C., Fremaux, C. dan Berjeaud, J.M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 67-74.
- Issa, Z.M. (2000). *Molecular Characterization of Lactobacillus plantarum Isolated from Malaysian Fermented Foods*. Abstract of MS thesis. University of Putra Malaysia.
- Kadere, T.T. dan Kutima, P.M. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria in coconut toddy (mnazi). *Journal of Asian Scientific Research* **2**(12): 807-819.
- Klayraung, S. dan Okonogi, S. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from Miang. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 757-766.
- Lambert, P.A. (2004). Mechanisms of action of biocides. *Dalam: Fraise, A.P., Lambert, P.A., dan Maillard, J-Y. (eds.). Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, Fourth edition, hal 139-153. Blackwell Publishing.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi, A. dan Tee, L.K. (2001). Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* **63**: 149-157.
- Lonkar, P., Harne, S.D., Kalorey, D.R. dan Kurkure, N.V. (2005). Isolation, In vitro antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of *Lactobacilli*, *Asian-Australian Journal Animal Science* **18**(9): 1336-1342.
- Ndaw, A.D., Faid, M., Bouseta, A. dan Zinedine, A. (2008). Effect of controlled lactic acid bacteria fermentation on the microbiological and chemical quality of Moroccan Sardines (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Agriculture and Biology* **10**(1): 21-27.
- Nikolova, D., Petrova, M., Evstatieva, Y., Danova, S. dan Atev, A. (2009). Antimicrobial activity of *Lactobacillus helveticus* strain 50P1. *Trakia Journal of Science* **7**(2): 40 -44.
- Oupathumpanont, O., Chantarapanont, W., Suwonsichon, T., Haruthaithanasan, V., dan Chompreeda, P. (2009). Screening Lactic Acid Bacteria for Improving the Kanom-jeen Process. *Kasetsart Journal of Natural Science* **43**: 557-565.



- Rahayu, E.S. (2003). Lactic acid bacteria in fermented food of Indonesian origin. *Agritech* **23** (2): 75-84.
- Salih, A.M.M., Hassan, Z.R. dan El Sanousi, S.M. (2011). Antimicrobial activity of selected probiotic bacteria isolated from Sudanese traditional dairy product "Rob". *Pakistan Journal of Nutrition* **10**(7): 637-639.
- Santoso, B., Maunatin, A., Hariadi, B.T. dan Abubakar, H. (2013). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal rumput raja (*Pennisetum purpureophoides*) sebagai kandidat probiotik pada ternak. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* **18**(2): 131-137.
- Sofyan, A., Utomo, R., Yusiati, L.M. dan Widyastuti, Y. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* from natural sources as feed-silage inoculants. *Proceeding The 3<sup>rd</sup> International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3<sup>rd</sup>IC-ISLAB)*.
- Teixeira De Mattos, P.J., Plomp, A.M., Neussel, O.M. dan Tempest, D.W. (1984). Influence of metabolic end-products on the growth efficiency of *Klebsiella aerogenes* in anaerobic chemostat culture. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 461-372.
- Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M. dan Dicks, L.M.T. (2007). Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control* **18**: 656-664.
- Usmiati, S., Miskiyah dan Rarah, R.A.M. (2009). The effect of bacteriosin of *Lactobacillus* sp. SCG 1223 to the microbiological quality of fresh beef. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* **14**(2): 150-166.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J.M., García-Gimeno, R.M., dan Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology* **133**: 186-194.
- Wikandari, P.R., Suparmo, Marsono, Y. dan Rahayu, E.S. (2012). Karakterisasi bakteri asam laktat proteolitik pada bekasam. *Jurnal Natur Indonesia* **14**(2): 120-125.
- Wirawati, C.U. (2002). *Potential of Lactic Acid Bacteria Isolate from Tempoyak as Probiotic*, MS thesis. Institute of Pertanian Bogor, Bogor.
- Yuliana, N. dan Garcia, V.V. (2009). Influence of *Pediococcus acidilactici* as a starter on the flavor of tempoyak (fermented durian). *Indian Journal of Biotechnology* **8**: 304-310.
- Yuliana, N. dan Dizon, E.I. (2011). Phenotypic identification of lactic acid bacteria isolated from tempoyak (fermented durian) made in the Philippines. *International Journal of Biology* **3**(2): 145-152.
- Zalán, Z., Németh, E., Baráth, A. dan Halász, A. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology* **43**(3): 219-225.