

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) DARI BUAH MANGGA (*Mangifera indica* L.)

Submitted : 25 Nov 2015

Edited : 15 Des 2015

Accepted : 21 Des 2015

Arsyik Ibrahim, Aditya Fridayanti, Fila Delvia

Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS Fakultas Farmasi Universitas

Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur

Email : achie.ibrahim@gmail.com; aditya@farmasi.unmul.ac.id

ila.liing@yahoo.co.id

ABSTRACT

*The research has been done for the isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) from mango (*Mangifera indica* L.). This research aimed to isolated of lactic acid bacteria that is in mango (*Mangifera indica* L.) and determine the characteristics of lactic acid bacteria isolate (LAB) of mango (*Mangifera indica* L.). The method used is spoiled technique of mango (*Mangifera indica* L.) and isolation using selective media MRS Broth and MRS Agar. The identification isolate of lactic acid bacteria (LAB) used methods macroscopically and microscopically with indirect coloring, gram staining and used biochemical with katalase testing. The results obtained in the form of characteristic isolate of lactic acid bacteria displayed form of bacteria with circle, smooth surface, curve, entire side and white. The microscopically displayed stick form of bacteria and purple with gram coloring.*

Keywords : *Mangifera indica* L., lactic acid bacteria, spoiled, isolation

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat adalah bakteri yang memiliki kontribusi yang besar dalam dunia pangan. Bakteri asam laktat selain biasanya digunakan sebagai pangan fungsional juga sering digunakan sebagai pengawet alami dari suatu produk pangan fermentasi. Penggunaan bakteri asam laktat sebagai pengawet alami dengan metode biopreservatif telah banyak dikembangkan dengan menggunakan bakteri asam laktat secara langsung atau menggunakan metabolitnya sebagai agen antimikroba.

Penggunaan BAL ini dikarenakan bakteri asam laktat disebut sebagai *food grade microorganisms* yang merupakan mikroba yang tidak beresiko terhadap kesehatan karena tidak menghasilkan racun berbahaya pada bahan pangan melainkan mempunyai fungsi sebaliknya yang baik bagi kesehatan. Hal ini karena bakteri asam laktat dapat menghambat secara alami mikroba patogen⁽¹⁾.

Beberapa metabolit aktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu asam laktat, etanol, hidroperoksida dan bakteriosin. Metabolit yang dihasilkan oleh bakteri tersebut merupakan agen yang dapat digunakan dalam membunuh bakteri. Salah satu yang digunakan sebagai antimikroba yaitu bakteriosin yang merupakan suatu senyawa peptida. Dilaporkan bahwa bakteriosin memegang peranan paling penting dalam menanggulangi infeksi akibat mikroorganisme. Selain itu asam laktat yang di produksi oleh BAL dapat menurunkan pH lingkungan. pH yang rendah dapat menghambat kontaminasi mikroba pembusuk dan juga membunuh mikroba patogen terutama yang ada didalam tubuh⁽²⁾.

Penelitian tentang isolasi BAL telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu (yoghurt, keju, dadih), fermentasi (tape, tempe, beer). Namun belum begitu banyak yang diisolasi dari buah-buahan dan sayur-sayuran tropis. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan

sayuran seperti durian, nanas, sirsak, cacao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, kacang panjang dan lain sebagainya adalah potensial sebagai sumber BAL⁽³⁾.

Kalimantan terkenal dengan produksi buah mangga yang berlimpah. Beberapa jenis mangga dapat ditemui di sini. Dilaporkan bahwa di Kalimantan terdapat 31 jenis *Mangifera indica* dan 3 jenis diantaranya adalah endemik. Dilaporkan bahwa di Kalimantan ditemukan 23 jenis *Mangifera* yang merupakan tumbuhan asli dan 4 jenis yang merupakan tumbuhan endemik. Sehingga dapat dikatakan bahwa Kalimantan merupakan pusat persebaran jenis-jenis mangga (*Mangifera* spp.)⁽⁴⁾.

Berdasarkan kemungkinan adanya bakteri asam laktat yang terdapat pada buah mangga (*Mangifera indica* L.) dan besarnya manfaat yang dihasilkan dari bakteri asam laktat. Maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi bakteri asam laktat dari buah mangga (*Mangifera indica* L.) serta mengidentifikasi karakteristik bakteri asam laktat (BAL) yang diperoleh.

METODE PENELITIAN

Bahan

Penelitian ini menggunakan objek penelitian yaitu buah mangga matang dengan jenis mangga yang diteliti yaitu mangga kweni (*Mangifera odorata*). Bagian yang akan diteliti adalah buah mangga kuweni masak yang telah menimbulkan aroma khas dan tidak cacat yang diperoleh dari desa Sekolaq Darat Kubar, medium de Men Rogrosa Sharpe (MRS) agar oxid, dan medium de Men Rogrosa Sharpe (MRS) broth oxid, *pepton water*, medium Potato Dektrosa Agar (PDA) dan Nutrient Agar (NA) Merck, NaCl 0,9%, larutan H₂O₂ 3%, cat kristal violet, cat lugol iodine, alcohol 96% dan safranin yang diperoleh dari laboratorium Farmasi Universitas Mulawarman.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu toples, pisau *cutter*, timbangan analitik, labu ukur, labu Erlenmeyer, cawan Petri, incubator, *laminar air flow*, autoklaf, kaca objek, *hot plate*, pinset, bunsen, cawan porselin, spatel logam, ose gores, rak tabung, mikroskop listrik.

Pelaksanaan Penelitian

1. Penyiapan Sampel

Sampel buah mangga diambil di daerah Sekolaq Darat Kubar. Buah mangga merupakan buah mangga masak dan tidak cacat, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering dikupas kulitnya dengan pisau staines steel steril.

2. Proses pembusukan

Sampel buah mangga yang telah dikupas dan dipotong dimasukkan ke dalam daun pisang steril dan dibungkus. Setelah dibungkus dimasukkan ke dalam wadah berupa toples kedap udara dan cahaya. Dilakukan pembusukan selama 72 jam pada suhu ruangan.

3. Pengenceran Sampel

Sampel hasil pembusukan di ambil *pulpnya*, dicampurkan lalu dimasukkan sebanyak 1 gram ke dalam tabung reaksi yang berisikan 9 mL *MRS broth*. Setelah dimasukkan di inkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Kemudian hasil inkubasi diambil dan dilakukan pengenceran dengan mengambil 100 µL hasil inkubasi ditambahkan ke dalam 900 µL *pepton water* sehingga diperoleh pengenceran 10⁻¹. Kemudian hasil dari pengenceran 10⁻¹ diambil kembali 100 µL dan dimasukkan kembali ke dalam tabung berisi *pepton water* 900 µL. Pengenceran terus dilakukan sampai didapat pengenceran 10⁻⁹.

4. Isolasi bakteri asam laktat (BAL)

Pengenceran 10⁻⁹ yang diperoleh diambil dengan menggunakan ose bulat sebanyak 1 ose. Kemudian dilakukan inokulasi ke dalam medium *MRS agar* dengan membagi cawan Petri ke dalam empat kuadran yaitu kuadran 1, kuadran 2, kuadran 3 dan kuadran 4 dilakukan metode gores membentuk *zig zag* bersambung tiap kuadran. Diinkubasi cawan petri selama 7 hari pada suhu 37 °C. Setelah proses inkubasi selesai dilanjutkan dengan mengisolasi koloni-koloni yang tumbuh masing-masing berdasarkan perbedaan morfologi koloni bakteri dalam cawan Petri setiap kuadran. Dilakukan isolasi sampai diperoleh isolat atau koloni tunggal dari tiap cawan petri.

5. Identifikasi bakteri asam laktat (BAL)

Isolat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan uji katalase dan metode makroskopik serta mikroskopik. Uji katalase dengan meneteskan larutan H₂O₂ pada *objek glass*,

kemudian diambil olesan bakteri dengan menggunakan ose dan dioleskan pada larutan pada *objek glass*, dilihat reaksi yang terbentuk jika tidak terbentuk gelembung menandakan reaksi positif. Metode makroskopik dengan melihat langsung morfologi isolat bakteri yang tumbuh pada medium meliputi bentuk dan warna bakteri. Dan metode mikroskopik dengan menggunakan mikroskop dengan metode pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan mengoleskan bakteri diatas *objek glass*, difikisasi lalu ditetesi cat gram A, diamkan selama 1 menit, ditetesi cat gram B, diamkan selama 1 menit, ditetesi cat gram C, diamkan selama 30 detik, ditetesi cat gram D, diamkan 2 menit. Kemudian ditutup dengan *cover glass* dan ditetesi dengan minyak emersi lalu diamati bentuk dan warna sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi bakteri asam laktat (BAL)

Isolasi bakteri merupakan sebuah teknik untuk mendapatkan koloni tunggal suatu bakteri. Isolasi bakteri asam laktat melalui proses pembusukan untuk mendapatkan bakteri asam laktat dan dengan menggunakan media selektif *de Men Rogrosa Sharpe* yang bertujuan mengoptimalkan pertumbuhan dan mendapatkan koloni bakteri asam laktat yang diharapkan.

Proses isolasi dilakukan proses *plating*, kultur dari pengenceran 10^{-9} diinokulasikan pada media MRS Agar dengan metode gores dengan dibagi dalam empat kuadran dan diinkubasi dalam inkubator. Koloni BAL tunggal yang tumbuh dimurnikan kembali dengan cara menginokulasikan kembali koloni ke dalam media MRS Agar (Merck) secara gores dan diinkubasi pada suhu selama 37°C 48 jam dalam suasana anaerob⁽³⁾. Hasil isolasi BAL dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil isolasi yang dilakukan diperoleh koloni tunggal dari buah mangga kuweni yang disebut sebagai isolat sebanyak satu isolat yang memiliki bentuk dan warna yang sama pada masing-masing kuadran goresan.

1. Identifikasi Isolat Hasil Isolasi

Identifikasi bakteri bertujuan untuk menentukan karakteristik khusus yang dimiliki oleh isolat yang diperoleh yang mempunyai karakteristik sama dengan bakteri yang diinginkan. Beberapa cara yang digunakan untuk

mengidentifikasi BAL pada penelitian ini yaitu dilakukan secara makroskopik, mikroskopik dan uji katalase.

a. Identifikasi Makroskopik

Identifikasi makroskopik dilakukan dengan melihat langsung isolat yang tumbuh pada media agar meliputi warna, bentuk, tepi, permukaan serta sudut elevasi yang terbentuk pada isolat. Hasil identifikasi mikroskopik dapat di lihat pada Tabel 1.

Dari hasil identifikasi secara makroskopik memperlihatkan hasil berupa isolat yang mempunyai warna putih susu, bentuk bulat, tepi *entire*, permukaan halus dan elevasi yang cembung. Hasil ini selanjutnya di sesuaikan dengan standar BAL hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya⁽¹⁾, BAL hasil isolasi dari buang mangga kuweni yang diperoleh menunjukkan gambaran morfologi makroskopik yang sama dengan BAL standar yang diperoleh pada penelitian sebelumnya.

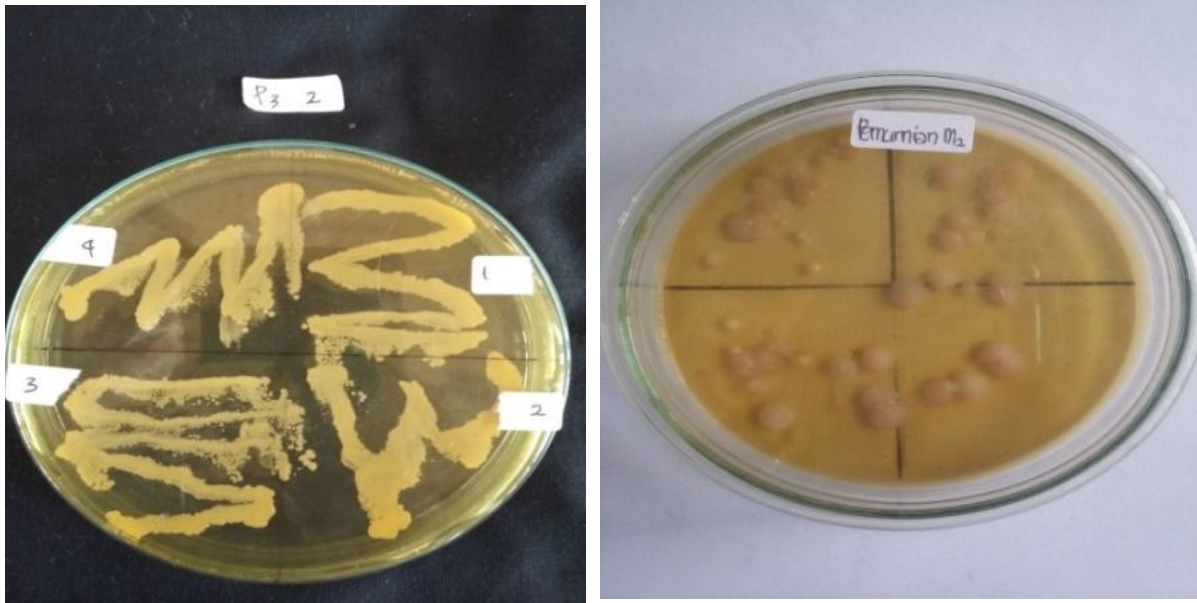
b. Identifikasi Mikroskopik

Identifikasi secara mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop listrik untuk melihat bentuk dari sel bakteri. Identifikasi bakteri asam laktat secara mikroskopik dilakukan dengan menggunakan pewarnaan tidak langsung dan pewarnaan gram. Morfologi BAL hasil pewarnaan dapat dilihat pada Gambar 2.

Pengamatan pada mikroskop dengan pewarnaan gram menunjukkan hasil pengujian bahwa sel bakteri berwarna ungu, hal ini menunjukan bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi termasuk dalam golongan bakteri gram positif dengan bentuk bulat bergandengan/berantai diduga dari genus *Streptococcus*. Bakteri gram positif mempunyai ciri dinding sel dengan peptidoglikon yang lebih tebal sehingga penyerapan warna dari cat kristal violet yang terserap dalam sel akan bertahan walaupun dilakukan pencucian menggunakan cat peluntur (larutan alkohol-lugol) yang diharapkan dapat melunturkan cat warna pertama. Dengan bertahannya cat warna kristal violet yang berwarna ungu ini di dalam sel bakteri maka cat gram D (safranin) sebagai cat lanjutan tidak akan bisa terserap lagi, sehingga warna sel akan tetap berwarna seperti warna cat yang dipakai pertama (cat kristal violet). Pengamatan secara mikroskopik tidak langsung menunjukkan hasil berupa bentuk

sel dari isolat bakteri yaitu berbentuk batang dengan dinding sel (a) dan selubung sel (b) serta

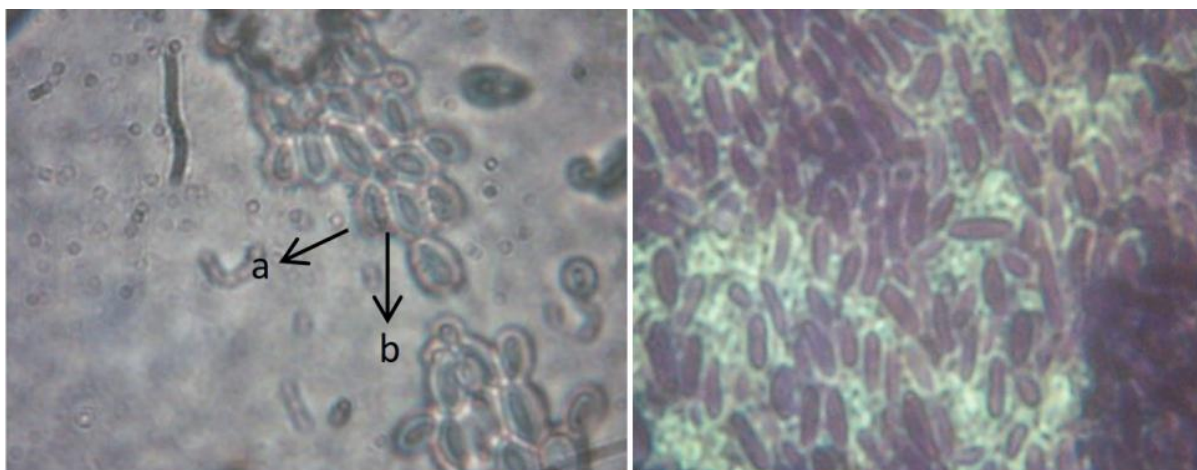
bentuk sel yang bergerombol membentuk rantai antara satu sel dengan sel yang lainnya.



Gambar 1. Hasil isolasi pada media MRS agar

Tabel 1. Identifikasi Isolat secara Makroskopik

No.	Isolat	Warna	Bentuk	Tepi	Permukaan	Elevasi
1.	M ₁	Putih susu	Bulat	Entire	Halus mengkilap	Cembung



Gambar 2. Identifikasi pewarnaan tak langsung dan gram secara Mikroskopik dengan perbesaran 100x

Keterangan :

a = selubung sel

b = sel bergerombol



Gambar 3. Hasil uji katalase

c. Identifikasi Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan larutan H₂O₂ 3% pada kultur muda (umur 24 jam). Sifat reaksi terhadap uji katalase ditentukan dengan pemunculan gelembung gas yang memberikan indikasi pembentukan gas CO₂⁽⁴⁾. Pengujian katalase adalah pengujian secara biokimiawi yang memperlihatkan aktivitas dari bakteri yang menghasilkan enzim katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung pada pengujian yang menandakan reaksi positif. Hasil ujikatalase dapat dilihat pada Gambar 3.

Uji katalase menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat (BAL) yang diuji menunjukkan hasil uji berupa katalase negatif dimana tidak terbentuknya gelembung pada *object glass* yang terdapat cairan H₂O₂ saat diolesi dengan bakteri. Hal ini dikarenakan bakteri asam laktat tidak memproduksi enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dan berkaitan dengan kemampuan bakteri asam laktat yang hanya membutuhkan sedikit oksigen untuk dapat hidup.

SIMPULAN

1. Isolat bakteri asam laktat dari buah mangga mempunyai karakteristik secara makroskopik yaitu warna putih susu, bentuk bulat, tepi *entire*, permukaan halus dan elevasi cembung.
2. Hasil identifikasi bakteri asam laktat dari buah mangga kweni (*Mangifera odorata*) menunjukkan hasil reaksi negatif terhadap uji katalase, merupakan bakteri gram positif bentuk bulat bergandengan/berantai (*Streptococcus*)

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Kepala Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS Fakultas Farmasi atas izin melaksanakan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Daeschel MA.1989. & Schillinger U & Lucke FK .1990. Citasi Fitriyani, Ida. Isolasi, Karakterisasi, Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga Matang Yang Berpotensi Menghasilkan Antimikroba. [Skripsi]. Yogyakarta, UIN Sunan Kalijaga; 2010.
2. Lawalata, Helen, J, Sembiring, L., Rahayu, E.,S. Bakteri Asam Laktat Pada Bakasang dan Aktivitas Penghambatannya Terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk. Prosiding Seminar Nasional Biologi Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta. 2010 : 1163 -1166.
3. Yuni Nurisva Sari Maya., YN., Syukur. S., Sari, J., Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) Yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*). J. Kimia Unand. 2013. (ISSN No. 2303-3401), 2 (2): 81-91.
4. Noor, A., , Ningsih, D.R., Hasbianto, A., Sabur, A., Sebaran Dan Keragaman Plasma Nutfah Mangga Di Kalimantan Selatan, Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian "Pengelolaan Sumber Daya Genetik Lokal sebagai Sumber Pertumbuhan Ekonomi Daerah". Kalimantan Selatan. 2015 : p. 2080218
5. Mirza Nuryady, M., Istiqomah. T., Faizah. R., Ubaidillah, S., Mahmudi. Z., Sutoyo. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Yoghurt. J. UNEJ. 2013, I (5): 1-11.