

UJI KETAHANAN BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI DARI KIMCHI
TERHADAP pH RENDAH

Agestiawan, I. G. A. M.¹, Swastini, D.A.¹, Ramona, Y.²

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

²UPT. Laboratorium Terpadu Biosains dan Bioteknologi Universitas Udayana

Korespondensi: I Gusti Agung Made Agestiawan

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalam Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 703837

Email: agestiaone@gmail.com

ABSTRAK

Probiotik merupakan mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan inangnya bila dikonsumsi dalam jumlah memadai. Beberapa jenis bakteri asam laktat (BAL) diketahui memiliki potensi sebagai probiotik. Kimchi merupakan salah satu produk makanan yang melibatkan beragam BAL dalam proses fermentasinya, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai sumber bakteri probiotik. Probiotik ketika dikonsumsi secara oral akan melalui lambung yang memiliki pH rendah (pH 2 saat puasa) dan harus mampu mempertahankan jumlah koloninya untuk mencapai usus besar. Sehingga, dalam pengembangannya sebagai probiotik potensial, dilakukan uji ketahanan BAL yang diisolasi dari kimchi pada pH rendah.

Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode dilusi sebar pada MRS agar yang telah ditambahkan BCP. Isolat BAL dipilih melalui uji konfirmasi dengan hasil negatif pada uji katalase, bersifat homofermentatif, Gram positif, dan berbentuk batang. Semua isolat BAL diuji ketahanannya pada kondisi pH 4, 3, dan 2. Ketahanan isolat BAL ditunjukkan oleh meningkatnya kekeruhan pada media MRS broth setelah diukur *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Apabila nilai OD $\geq 0,1$ maka strain BAL tersebut dikategorikan tahan terhadap pH rendah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 66 isolat BAL yang berhasil diisolasi dalam penelitian ini, dan sebanyak 15 isolat diuji ketahanannya terhadap pH rendah. Sebanyak 15 isolat yang diuji menunjukkan sifat tahan terhadap kondisi 4, 3, dan 2.

Kata Kunci : uji ketahanan, pH rendah, probiotik, kimchi

1. PENDAHULUAN

Probiotik merupakan mikroba hidup yang bila dikonsumsi dalam jumlah memadai akan membantu inangnya dalam menjaga flora normal saluran pencernaannya (Feliatra dan Suryadi, 2004). Bakteri asam laktat (BAL) telah lama digunakan sebagai probiotik, termasuk didalamnya jenis *Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *L. Sporogenes*, *L.*

Casei, *L. plantarum*, dan *Streptococcus* (Venkat et al., 2004). Penelitian secara intensif telah banyak dilakukan untuk mengisolasi bakteri asam laktat sebagai probiotik dari bahan pangan. Schingllier dan Lucke (1989), Moulay et al. (2006), serta Tamang et al. (2008), misalnya berturut-turut berhasil mengisolasi bakteri asam laktat berupa *Lactobacillus sakei* dari daging,

Leuconostoc lactis dari susu Kambing Algeria dan *Lactobacillus brevis* dari batang bambu terfermentasi.

Kimchi merupakan makanan tradisional korea berupahasil fermentasi sayuran. Kandungan bakteri asam laktat pada kimchi diketahui sebesar 10^8 sel/gram, dengan berbagai macam mikroorganisme yang terlibat dalam proses fermentasinya (Kim, *et al.* 2000). Bakteri asam laktat yang diketahui terdapat dalam kimchi

yaitu *Leuconostoc mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. lactis*, *Lactobacillus brevis* dan *L. plantarum* (Lee *et al.*, 2002). Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* telah banyak digunakan sebagai probiotik (Ishibashi dan Yamazaki, 2001).

Uji ketahanan bakteri probiotik pada pH rendah perlu dilakukan untuk mengetahui tingkat ketahanan BAL pada pH rendah sebelum dikembangkan sebagai probiotik. Suatu strain bakteri probiotik harus mampu mempertahankan jumlah koloninya saat melewati saluran gastrointestinal yang kondisinya sangat asam (dapat mencapai pH 2 bila dalam keadaan berpuasa) dalam perjalanannya menuju usus besar (Jacobsen *et al.*, 1999; Kong dan Singh, 2008).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan isolasi BAL yang diisolasi dari kimchi dengan sifat homofermentatif, uji katalase negatif, gram positif dan berbentuk batang yang dilanjutkan dengan uji ketahanan terhadap pH rendah untuk mengetahui potensinya dalam pengembangan probiotik potensial.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel produk kimchi yang berasal dari rumah makan di Denpasar, Media *de Man Regosa and Sharpe* (MRS) *broth* (terdiri dari 20g/l dekstrosa, 10g/l pepton, 8g/l *beef extract*, 5g/l Na-asetat, 4g/l *yeast extract*, 2g/l dipotassium fosfat, 1g/l tween 80, 2g/l diamonium sitrat, 0,2g/l magnesium sulfat, dan

0,05g/l mangan sulfat) (Pronadisa), media MRS agar (Pronadisa), anaerobpack (*Mitsubishi gas*), normal saline (NaCl 0.85%), etanol 96% (Merck), set pengecatan gram (Bioanalitika), larutan HCl, aluminium foil, gliserol, dan *bromocresol purple*.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Kimchi

Isolasi BAL dari kimchi dilakukan dengan metode pengenceran dan sebar. Sebanyak 1 gram sampel kimchi disuspensikan ke dalam 5 ml medium MRS *broth*, divortex hingga homogen, diambil sebanyak 0,1 ml untuk disuspensikan kembali ke dalam 5 ml media MRS *broth*, divortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob menggunakan anaerobpack (*Mitsubishi gas*). Selanjutnya, sebanyak 50 µl sampel ini disuspensikan ke dalam 5 ml MRS *broth* pH 5,5, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob. Suspensi bakteri yang terbentuk diencerkan menggunakan normal saline hingga diperoleh tingkat pengenceran 10^{-2} – 10^{-7} . Tabung dengan seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} diambil masing-masing sebanyak 0,1 ml, disebar merata pada permukaan media MRS agar yang telah ditambahkan BCP (*Bromo Cresol Purple*), dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob. Koloni bakteri yang berbentuk batang *distreak for single colony* pada media MRS agar, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob. Koloni yang tumbuh diinokulasi ke dalam 5 ml MRS *broth*, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob. Isolat BAL selanjutnya disuspensikan pada larutan gliserol 30%, dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C sebagai *stock culture*.

2.2.2 Pewarnaan Gram

Isolat BAL dibuat hapusannya pada permukaan gelas objek, difiksasi di atas bunsen, diwarnai dengan gentian violet selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir, ditetesi dengan larutan lugol, didiamkan selama 1 menit, dan

dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya, hapusan dicuci dengan alkohol 96%, dicuci kembali dengan akuades steril, diwarnai dengan safranin selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan difiksasi di atas bunsen, dan diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan minyak emersi (perbesaran 1000 kali). Bakteri gram positif akan berwarna biru keunguan di bawah mikroskop (Lay, 1994).

2.2.3 Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan membuat hapusan isolat BAL pada permukaan gelas objek, ditambahkan 2 tetes H₂O₂ 10% dan diamati gelembung gas yang terbentuk pada preparat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas oksigen yang dihasilkan dari degradasi H₂O₂ oleh enzim katalase (Soemarno, 2000; Hadioetomo, 1990).

2.2.4 Uji produksi gas hasil metabolisme glukosa

Jarum ose panas (*hot-loop*) dimasukkan ke dalam suspensi isolat BAL. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas karbondioksida hasil metabolisme glukosa (Sperber dan Swan, 1976). BAL homofermentatif memberikan hasil negatif pada uji ini, sedangkan BAL heterofermentatif menunjukkan hasil positif pada uji ini (Sujaya *et al.*, 2008).

2.2.5 Uji Ketahanan BAL terhadap pH Rendah

Sebanyak 50 µl kultur dari *stock culture* diinokulasi ke dalam 5 ml MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri ini diambil masing-masing sebanyak 100 µl, dimasukkan ke dalam 3 buah *eppendorf* yang telah berisi 900 µl media MRS *broth* dengan variasi pH (pH 2, 3 atau 4), diinkubasi selama 3 jam dalam *water bath* pada suhu 37°C, disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit dan supernatnya dibuang. Pelet sel pada dasar tabung dicuci dengan 300 µL normal salin, divortex dan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Pengerjaan tersebut diulang

sebanyak 3 kali. Pelet sel pada dasar tabung ditambahkan 300 µL normal salin, kemudian diambil sebanyak 50 µL untuk diinokulasikan ke dalam 5 ml media MRS *broth* pH 7, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Nocianitri *et al.*, 2011).

Ketahanan isolat BAL ditunjukkan oleh meningkatnya kekeruhan setelah diukur *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Bila nilai *Optical Density* OD < 0,1 maka strain bakteri tersebut dikategorikan tidak tahan terhadap pH rendah, dan bila nilai OD ≥ 0,1 maka strain BAL tersebut dikategorikan tahan terhadap pH rendah (Nocianitri *et al.*, 2011; Hyronimus *et al.*, 2000).

3. HASIL

3.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Kimchi

Dari proses isolasi diperoleh sebanyak 66 isolat BAL (berbentuk bulat dan batang) yang menunjukkan hasil negatif pada uji katalase, bersifat homofermentatif, dan Gram positif. Dari 66 isolat tersebut, terdapat sebanyak 15 isolat (Tabel 1) yang berbentuk batang melalui pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop yang dipelajari potensinya lebih mendalam pada penelitian selanjutnya.

3.2 Uji Ketahanan BAL yang Diisolasi dari Kimchi terhadap pH Rendah

Pada penelitian ini, semua isolat BAL (15 isolat) yang diuji menunjukkan sifat tahan terhadap pH rendah dengan nilai OD ≥ 0,1 (Tabel 2).

4. PEMBAHASAN

Isolasi BAL pada medium MRS Agar dengan indikator *Bromocresol Purple* (BCP) difokuskan pada strain-strain dengan uji katalase negatif, homofermentatif, Gram positif, dan berbentuk batang. pH medium diatur sebesar 5,5 (seperti yang dilakukan oleh Marman, 2006; Park dan Oh, 2006) untuk memberikan kondisi optimum bagi pertumbuhan BAL. Pertumbuhan

Tabel 1. Nilai Absorbansi Ketahanan Isolat BAL yang Diisolasi dari Kimchi terhadap pH Rendah

No	Kode Isolat	Indikator Pertumbuhan BAL (<i>Optical Density</i> (OD)) pada λ 660 nm dalam media dengan variasi pH*			
		pH 6,5 (Kontrol) (OD \pm SD)	pH 4 (OD \pm SD)	pH 3 (OD \pm SD)	pH 2 (OD \pm SD)
1	Kim 7	1,869 \pm 0,032	1,914 \pm 0,014	1,889 \pm 0,019	1,724 \pm 0,008
2	Kim 9	1,917 \pm 0,038	1,934 \pm 0,007	1,976 \pm 0,083	1,863 \pm 0,008
3	Kim 18	1,897 \pm 0,019	1,975 \pm 0,013	1,981 \pm 0,024	1,877 \pm 0,005
4	Kim 19	1,913 \pm 0,009	1,955 \pm 0,019	1,959 \pm 0,003	1,834 \pm 0,037
5	Kim 20	1,865 \pm 0,007	1,913 \pm 0,014	1,874 \pm 0,012	1,852 \pm 0,014
6	Kim 21	1,731 \pm 0,015	1,777 \pm 0,021	1,725 \pm 0,018	1,647 \pm 0,011
7	Kim 23	1,996 \pm 0,014	2,010 \pm 0,004	2,018 \pm 0,011	1,708 \pm 0,022
8	Kim 26	1,765 \pm 0,020	1,850 \pm 0,013	1,751 \pm 0,011	1,645 \pm 0,044
9	Kim 36	1,787 \pm 0,014	1,833 \pm 0,021	1,780 \pm 0,022	1,657 \pm 0,004
10	Kim 41	1,723 \pm 0,023	1,760 \pm 0,054	1,676 \pm 0,01	1,659 \pm 0,013
11	Kim 45	1,940 \pm 0,026	1,972 \pm 0,015	1,964 \pm 0,008	1,760 \pm 0,045
12	Kim 48	1,955 \pm 0,011	1,959 \pm 0,010	1,980 \pm 0,024	1,826 \pm 0,036
13	Kim 55	1,817 \pm 0,031	1,860 \pm 0,007	1,792 \pm 0,003	1,739 \pm 0,030
14	Kim 59	1,813 \pm 0,026	1,881 \pm 0,023	1,876 \pm 0,012	1,712 \pm 0,021
15	Kim 64	1,721 \pm 0,022	1,797 \pm 0,026	1,766 \pm 0,025	1,666 \pm 0,023

Keterangan: + = OD \geq 0,1 (tahan pH rendah) ; - = OD \leq 0,1 (tidak tahan pH rendah)

*Nilai OD \pm standar deviasi nilai absorbansi isolat BAL yang diisolasi dari kimchi dan rata-rata dari 3 kali pengulangan

koloni BAL pada medium MRS yang ditambahkan indikator BCP dapat dibedakan dari koloni bakteri lain, karena asam yang diproduksi oleh BAL pada medium ini akan mengubah warna medium dari warna ungu menjadi kuning (Moulay et al., 2006). Pemilihan BAL yang berbentuk batang pada penelitian ini (Tabel 1) adalah untuk menghindari bakteri yang bersifat enterik yang sering menimbulkan masalah dalam saluran pencernaan. Bakteri enterik umumnya berbentuk bulat dan bersifat homofermentatif. Menurut Mheen (2004), bakteri enterik yang sering ditemukan pada kimchi adalah *Enterococcus*. Dalam proses fermentasi, kelompok bakteri enterik memiliki produksi asam laktat yang rendah, sehingga

tidak cukup untuk memberi efek bakterisidal pada mikroba patogen yang masuk ke dalam saluran pencernaan (Satria, 2005). Selain itu, bakteri ini dapat memproduksi gas CO₂ yang dapat menyebabkan kembung pada hostnya, sehingga kelompok bakteri tersebut kurang diminati untuk pengembangan probiotik.

Pada penelitian ini, semua isolat BAL yang diuji menunjukkan sifat tahan terhadap pH rendah (Tabel 2). Seperti terlihat pada Gambar 1, semua isolat memiliki pertumbuhan yang baik pada pH 4, 3, dan 2 dengan jumlah sel yang mendekati kontrol setelah diinkubasi selama 3 jam, sesuai waktu yang dibutuhkan makanan untuk melewati lambung (Oozer et al., 2006). Hasil ini mengindikasikan bahwa semua isolat

dapat digunakan dalam berpotensi dikembangkan sebagai probiotik.

Menurut Hutkins dan Nannen (1993), suatu organisme dapat bertahan hidup pada lingkungan pH rendah dengan cara mempertahankan kondisi pH internalnya relatif lebih tinggi daripada pH lingkungannya. Mekanisme ini dilakukan dengan mengaktivasi enzim ATP-ase, sehingga dihasilkan energi yang dapat digunakan untuk mentranslokasi proton dari dalam sel menuju keluar sel, sehingga terjadi peningkatan pH di dalam sitoplasma sel (Chou dan Weimer, 1999).

5. KESIMPULAN

Hasil uji ketahanan BAL yang diisolasi dari kimchi terhadap pH rendah menunjukkan bahwa 15 isolat BAL dengan sifat homofermentatif, katalase negatif, gram positif, dan berbentuk batang dapat bertahan hidup pada kondisi media dengan pH 2, 3, dan 4, sehingga dapat dikembangkan sebagai probiotik.

6. UCAPAN TERIMA KASIH

Ibu Ni Wayan Nursini, S.Tp., M.P., selaku staf UPT Laboratorium Terpadu Biosains dan Bioteknologi Universitas Udayana atas bantuan, masukan, saran, dan motivasinya.

DAFTAR PUSTAKA

Chou, L. S. dan Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid and Bile Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Sci.* 62: 1052-1063

Feliatra, Efendi, I., dan Suryadi, E. (2004). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *J. Natur. Ind.*, 6(2): 75-80.

Hadioetomo, R. S. (1990). *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek, Teknik dan*

Prosedur Dasar Laboratorium. Jakarta : PT Gramedia

Hutkins, S. K. dan Nannen, N. L. (1993). pH Homeostatis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 76(8): 2354-2365

Hyronimus, B., Mareec, L. C., Sassi, A.H., dan Deschamps, A. (2000). Acid and Bile Tolerance of Spore-forming Lactic Acid Bacteria. *J. Food. Microbiol.* 6(2): 193-197.

Ishibashi, N. dan Yamazaki, S. (2001). Probiotics and Safety. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(2): 465s-470s

Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Erregard, A. P., Sandstorm, B., Tvede, M., dan Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty Seven Strain of *Lactobacillus sp.* by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strain in Human. *Appl and Environment Microbiol.* 65: 4949-4956

Kim, J., Chun, J., dan Han, H. (2000). *Leuconostoc kimchii Sp. Nov.*, A New Species From Kimchi. *Republic Korea: International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology* 50: 1915-1919

Kong, F. dan Singh, R. P., (2008). Disintegration of Solid Food in Human Stomach. *Journal of Food Science.* 73(5): R67-R80

Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium.* Jakarta : Rajawali

Lee, J. S., Lee K. C., Ahn, J. S., Mheen, T. I., Pyun Y. R., dan Park, Y. H. (2002). *Weissella koreensis Sp. Nov.*, Isolated From Kimchi. *Korea*

- Research Institute Of Bioscience And Biotechnology*. 52(4):1257-61
- Marman, W. (2006). Proses Pembuatan dan Analisis Mutu Yoghurt. *Buletin Teknik Pertanian*. 11(1); 10-12
- Mheen, T. I. (2004). Kimchi Fermentation and Characteristics of the Related Lactic Acid Bacteria. *Korean Ins. Science*. Pp 454-480
- Moulay, M., Aggad, H., Bemmechemene, Z. Guessas, B., Henni, D. E. dan Kihal, M. (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *World Journal Of Dairy & Food Sciences*. (1): 12-18
- Nocianitri, K. A., Permana, I. D. G. M., dan Sujaya, I. N. (2011). Skrining *Lactobacillus Spp.* untuk Pengembangan Probiotik Berbasis Susu Kedelai. *The Excellence Research* 8: 113-120
- Oozer, R., Leplingard, A., Mater, D. D. G., Mogenet, A., Michelin, R., Seksek, I., Marteau, P., Dore, J., Bresson, J. L., dan Corthier, G. 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the Human Digestive Tract After Consumption of Fermented Milk. *Appl and Enviro Microbiol*. 5615-5617
- Park, K. B. dan Oh, S. H. (2006). Isolation and characterization of a lactic acid bacterium with high γ -aminobutyric acid producing capacity from kimchi, a traditional Korean fermented food. *The FASEB Journal* (20) A430-A431
- Satria, Hasrul. 2005. Pembentukan Asam Organik oleh Isolasi Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian. *Bioscientiae* (1):15-24
- Schingllier, U. dan Lucke, F. K. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Appl. Environ. Microbiol*. 55(8): 1901-1906
- Soemarno. (2000). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik*. Akademi Analisa Kesehatan Yogyakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hal : 117-119
- Sperber, W. H. dan Swan, J. (1976). Hot-loop Test for The Determination of Carbon Dioxide Production from Glucose by Lactic Acid Bacteria. *App Environ Microbiol* 31:990-991
- Sujaya, N., Ramona, Y., Widarini, N. P., Suariani, N. P., Dwipayanti, N. M. U, Nocianitri, K. A., dan Nursini, N. W. (2008). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner*. 9(2): 52-59
- Tamang, B., Schilinger, U., Franz, C. A. M. P., Gores, M., dan Holzapfel, W.H. (2008). Phenotypic And Genotypic Identification Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Ethnic Bamboo Tender Shoots Of North East India. *Int. J. Food Microbiol*. 121 (1): 35-40
- Venkat H.K., Narottam, P. Sahu dan Kamal K Jain. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Aquaculture Research*, 35: 501-507.