

## **ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA DARI KIMCHI**

### ***Isolation of Lactic Acid Bacteria Producing Exopolysaccharide from Kimchi***

Anton Nudyanto<sup>1\*</sup>, Elok Zubaidah<sup>1</sup>

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya, Malang  
Jl. Veteran, Malang 65145

\*Penulis Korespondensi, Email : annudyanto@gmail.com

#### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat yang mampu memproduksi eksopolisakarida dalam jumlah besar. Eksopolisakarida merupakan polimer gula yang dihasilkan oleh bakteri. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang aman dikonsumsi manusia, dan kimchi merupakan salah satu sumber bakteri tersebut. Penelitian ini bersifat deskriptif, hasil dari penelitian akan dianalisis secara deskriptif. Dari hasil penelitian didapatkan 9 jenis isolat bakteri asam laktat yaitu A.2.1, A.2.2, A.4.1, A.4.2, A.4.3, B.2.1, B.2.2, B.3.1, dan B.4.1 yang memiliki ciri-ciri morfologi berbentuk basil atau batang, gram positif, katalase negatif, tidak memproduksi gas, dan kecepatan pengasaman lambat. Produksi EPS pada media MRS Broth dari isolat BAL yang diperoleh dari kimchi berkisar antara 99-427 mg/L. Dari 9 isolat, hanya isolat A.2.2 yang tidak mampu memproduksi EPS dari isolat kontrol yaitu *Lactobacillus casei* (106.33 mg/L). Isolat yang mampu memproduksi EPS tertinggi adalah isolat B.3.1 (427 mg/L).

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat, Eksopolisakarida, Kimchi

#### **ABSTRACT**

*Objective of this study was to get isolate of lactic acid bacteria that has ability to produce high exopolysaccharide. Exopolysaccharide is a sugar polymer that produced by bacteria. Lactic acid bacteria are safe bacteria to be consumed by human, and kimchi is one of kind that become the source of this bacteria. This research was a descriptive descriptive research, where the result from several test will be analyzed descriptively. From this research, there was 9 isolates of LAB such as A.2.1, A.2.2, A.4.1, A.4.2, A.4.3, B.2.1, B.2.2, B.3.1, and B.4.1 and these has morphological character are bar shape, positive gram bacteria, negative catalase, does not produce gas, and has a low speed in acidification. EPS production by using MRS media from 99-427 mg/L. From 9 isolates only isolate A.2.2 can't produce EPS higher from control (*Lactobacillus casei* with 106.33 mg/L). Isolate with highest EPS production was isolate B.3.1 (427 mg/L).*

*Keywords: Lactic Acid Bacteria, Exopolysaccharide, Kimchi*

#### **PENDAHULUAN**

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan disekresikan dari mikroba. EPS telah diteliti karena memiliki berbagai macam potensi, antara lain dalam bidang farmasi, pangan dan kesehatan. Dalam makanan EPS bermanfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgaor, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan [1].

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang membentuk asam laktat, sebagai produk utama dalam metabolisme karbohidrat. Beberapa ciri yang dimiliki oleh BAL adalah tergolong dalam Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk coccus atau basil dan pada umumnya katalase negatif. BAL banyak ditemukan pada produk makanan

olahan baik produk hewani dan nabati yang difermentasi (sosis, kimchi, sayur asin) dan produk olahan susu [2]. Kimchi merupakan sumber bakteri asam laktat, berbagai macam jenis BAL dapat ditemukan dan telah diidentifikasi selama proses fermentasi kimchi [3].

BAL juga merupakan bakteri yang mampu memproduksi EPS. EPS yang diproduksi BAL berfungsi sebagai bentuk perlindungan sel bakteri terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim dan berntuk pertahanan diri dari sel lain dan bakteriofag. EPS yang diproduksi BAL mempunyai risiko kontaminasi toksin yang kecil. EPS dari BAL dapat diaplikasikan pada makanan karena BAL aman dikonsumsi manusia (dalam kata lain *GRAS – Generally Recognized as Safe*). EPS produksi oleh BAL mempunyai banyak potensi untuk dikembangkan sebagai bahan makanan fungsional yang baik dan berguna bagi kesehatan [4].

Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan eksopolisakarida yang tinggi dari kimchi yang dijual di pasaran.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Bahan**

Bahan untuk isolasi meliputi kimchi dalam kemasan yang didapatkan dari supermarket di kota Malang. Media yang digunakan adalah MRSB (*de Mann Rogose Sharpe Broth*) merk Pronadisa dan *Bacteriological Agar* merk Pronadisa. Bahan kimia yang dipergunakan dalam yaitu NaCl, alkohol 70%, aquades, CaCO<sub>3</sub>, etanol 96%, larutan buffer pH 4 dan pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, pengecatan gram menggunakan larutan kristal violet, iodin, dan safranin. Serta menggunakan gliserol 40% untuk mengawetkan kultur mikroba. Bahan-bahan lain yang diperlukan antara lain spiritus, kertas payung, kertas koran, karet gelang, minyak emersi, plastik PP, aluminium foil, plastic wrap, dan kapas.

### **Alat**

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah: kompor listrik (Maspion S-300), vortex (Turbo Mixer LW Scientifec), timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204) dan timbangan digital (Denver instrument M-310), stomacher (Seward), inkubator (Binder dan WTC Binder, Banstead Jerman), sentrifuse dingin (Thermo Scientific tipe SL40 Jerman) dan tube sentrifuse 50 ml, autoklaf (Hirayama model HL-36 AE Jepang), colony counter (WTV BZG 30), pH meter (Hanna Instrument Italia), refrigerator, mikroskop (termasuk gelas benda dan gelas penutup) (Olympus), pupilcam, laminar air flow (buatan lokal), bunsen, ose, pipet mikro (Socorex, Finpipette Digital, Nichiryo, dan Eppendorf), tip, tissue, serta falcon 2 ml.

Peralatan glassware yang diperlukan yaitu tabung reaksi, petridish, beaker glass 1L, gelas ukur, erlenmeyer, pipet volume dan 10 ml, bola hisap, pipet tetes, hokey glass dan tabung durham.

### **Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Hasil yang diperoleh dari berbagai jenis pengujian akan dianalisis secara deskriptif. Dari hasil uji produksi EPS dipilih isolat terbaik yang berpotensi untuk menghasilkan EPS terbanyak [5]

### **Tahapan Penelitian**

Tahapan penelitian dilakukan dengan empat tahapan, yang pertama adalah mengisolasi bakteri asam laktat dari kimchi, kemudian uji konfirmasi isolat bakteri asam laktat. Setelah mendapatkan isolat, isolat tersebut diawetkan dan dilakukan uji produksi eksopolisakarida.

### **Metode**

Isolasi bakteri asam laktat dari kimchi meliputi tahapan pengenceran dan inkubasi. Konfirmasi isolat bakteri asam laktat meliputi pengamatan morfologis, pewarnaan gram, uji

gram, uji katalase, uji produksi gas, dan uji kecepatan pengasaman. Setelah itu kultur diawetkan dan dilakukan uji produksi eksopolisakarida.

### **Prosedur Analisis**

#### **1. Isolasi Bakteri Asam Laktat**

Kimchi ditimbang secara aseptis sebanyak 5 gram di masukkan kedalam erlenmeyer berisi 45 ml NaCl 0.85% kemudian didistilasi. Larutan hasil distilasi tersebut dibuat seri pengenceran ( $10^{-2}$  sampai  $10^{-7}$ ) dalam larutan NaCl 0,85% steril. Masing-masing seri pengenceran diambil 0.1 ml dengan mikropipet secara aseptis dan ditanamkan pada media MRSB yang diperkaya dengan  $\text{CaCO}_3$  1% secara spread plate. Inkubasi dilakukan pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 48 jam. Koloni yang diduga BAL (warna putih, bulat, dan tepian jelas terdapat zona bening) selanjutnya dipindahkan ke media padat MRSA, untuk selanjutnya dimurnikan dan diidentifikasi [6].

#### **2. Konfirmasi Isolat Bakteri Asam Laktat**

Konfirmasi dilakukan terhadap semua isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi dari kimchi berdasarkan pengamatan morfologi bakteri, pewarnaan gram serta uji karakteristik biokimia yang mencakup uji katalase, uji produksi gas dan uji kecepatan pengasaman.

#### **3. Persiapan dan Pengawetan Kultur**

Isolat bakteri asam laktat yang telah murni diremajakan dan diperbanyak dengan cara mengambil satu ose untuk ditumbuhkan dalam 5 ml MRSB, kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 18 jam. Kultur dari media MRSB tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan gliserol 40% sebanyak satu ml dan disimpan dalam suhu beku. Kultur juga ditumbuhkan pada 5 ml media MRSA padat dengan posisi miring dan media MRSA posisi tegak dan diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$ . Kultur tersebut dapat langsung digunakan dan diremajakan sebanyak sebulan sekali.

#### **4. Uji Produksi Eksopolisakarida**

Uji eksopolisakarida terhadap isolat dari sayuran fermentasi dilakukan dengan mengetahui jumlah eksopolisakarida dari isolat BAL yang telah berhasil diperoleh pada tahap isolasi dengan cara 25 mL kultur pada medium MRSB dimasukkan ke tabung sentrifuge 50 ml, kemudian disentrifugasi dengan sentrifuge dingin  $4^\circ\text{C}$  pada 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan ditambah etanol dingin (96%) (2 kali dari volume) selama semalam. Kemudian disentrifugasi dengan sentrifuge dingin  $4^\circ\text{C}$  pada 5000 rpm, 25 menit. Pellet dikeringkan pada suhu  $105^\circ\text{C}$ , lalu ditimbang berat kering EPS [7].

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Kimchi**

Kimchi yang digunakan dalam penelitian ini sudah melalui tahapan pengujian asam, nilai pH sebesar 3.86 menunjukkan bahwa bahan cukup asam karena akumulasi asam laktat yang cukup tinggi akibat aktivitas fermentasi. Metode isolasi bakteri asam laktat menggunakan metode spread plate, dan dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan metode streak plate untuk mendapatkan koloni tunggal yang terpisah. Media yang digunakan saat isolasi adalah deMan Rogosa Sharpe Agar (MRSA) yang ditambah kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) sebanyak 1% dari media. Inkubasi dilakukan selama 48 jam. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL akan mengikat  $\text{CaCO}_3$  menjadi Ca-laktat yang larut, sehingga menimbulkan zona bening. Zona bening tersebut dapat digunakan sebagai penanda terdapatnya koloni bakteri asam laktat [8]. Kenampakan isolat BAL pada media dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni BAL ditunjukkan dengan Penampakan Zona Bening di sekitarnya pada media MRSA dengan  $\text{CaCO}_3$

## 2. Konfirmasi Isolat dari Kimchi

Pada penelitian ini didapatkan 9 isolat dari hasil pemurnian. Uji konfirmasi dilakukan untuk membuktikan bahwa isolat yang didapat dari kimchi ini merupakan bakteri asam laktat. Pada penelitian ini tidak dilakukan uji secara sepsifik untuk mengetahui genus dan spesies dari jenis BAL. Uji konfirmasi ini mengikuti karakteristik kunci dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Uji konfirmasi meliputi pengamatan morfologi, pewarnaan gram, uji produksi gas, uji katalase, dan uji kecepatan pengasaman. Hasil Uji konfirmasi dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Uji Konfirmasi Isolat Asal Kimchi**

Isolat	Pengamatan Morfologi Koloni			Pewarnaan Gram		Produksi Gas	Katalase	Kecepatan Pengasaman
	Bentuk	Warna	Tepian	Warna	Gram			
A.2.1	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
A.2.2	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
A.4.1	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
A.4.2	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
A.4.3	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
B.2.1	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
B.2.2	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
B.3.1	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat
B.4.1	bulat	putih	entire	Ungu	+	-	-	Lambat

Keterangan: Tepian "entire" adalah bertepi rata, tidak bergelombang

## 3. Uji Produksi Eksopolisakarida

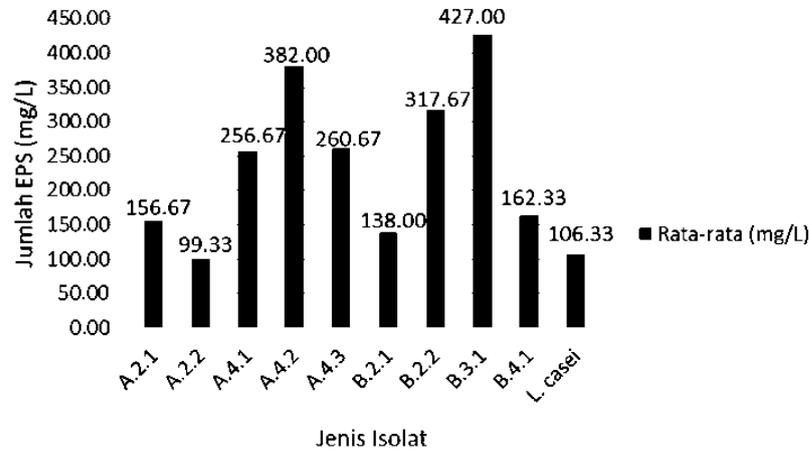
Eksopolisakarida biasa dihasilkan oleh mikroba ke luar sel biasa ditemukan pada bagian luar dari struktur bakteri. EPS terhubung dengan sel dalam bentuk kapsul atau lendir yang terdapat pada permukaan sel. EPS memiliki varietas yang luas serta struktur kimia yang kompleks, dan mempunyai sifat antimikrobia [9].

Prinsip pengujian eksopolisakarida kasar dilakukan dengan pemisahan EPS dari membran sel bakteri dengan menggunakan sentrifuse dingin untuk mendapatkan supernatant. Supernatant yang mengandung EPS dari sel bakteri kemudian dipresipitasi dengan alkohol dingin 96% selama semalam. Supernatant yang didapat juga terdapat protein di dalamnya, dan untuk menghilangkan protein tersebut dilakukan pemisahan lagi dengan sentrifuse dingin dan akhirnya didapatkan pellet. Pellet yang diperoleh dikeringkan dalam oven listrik untuk memperoleh berat konstan EPS kasar (gravimetric) [10].

Eksopolisakarida yang dihasilkan sebagian besar mikroba tergolong heteropolisakarida. Heteropolisakarida sendiri memiliki sifat yang berbeda, sifat dari heteropolisakarida tergantung dari monosakarida penyusun dan ikatan antar monosakarida

tersebut. Heteropolisakarida disintesa dengan prekursor polimerisasi yang dibentuk dalam sel sitoplasma. Untuk mengetahui golongan eksopolisakarida biasanya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui komponen gula penyusun eksopolisakarida tersebut [11].

Isolat dari kimchi dalam memproduksi EPS dengan menggunakan medium MRSB dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Produksi EPS dari isolat kimchi pada media MRSB

Dari Gambar 2 dapat diketahui bahwa kesembilan isolat BAL dari kimchi memiliki kemampuan memproduksi eksopolisakarida kasar dengan jumlah yang bervariasi. Produksi eksopolisakarida kasar dari kimchi berkisar antara 99-427 mg/L. Produksi EPS tertinggi adalah isolat B.3.1 dengan 427 mg/L dan produksi tersebut lebih tinggi dibanding kontrol (*Lactobacillus casei*) yang hanya memproduksi 106.33 mg/L. Dari keseluruhan produksi EPS dari isolat kimchi adalah dari kisaran 99.33-427 mg/L. Isolat yang mampu memproduksi EPS dari lebih dari isolat kontrol kecuali A.2.2.

Kemampuan memproduksi EPS suatu isolat pada umumnya dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan yang disebut fenotip [7]. EPS yang diproduksi bakteri juga dipengaruhi oleh jenis gula yang terkandung dalam medium [12]. Pada medium ini digunakan MRSB yang sumber gulanya adalah glukosa. Sukrosa dianggap sumber gula yang terbaik bagi BAL khususnya dari genus *Lactobacillus* [13], namun karena isolat bakteri dari kimchi ini belum diketahui genus-nya belum dapat diketahui sumber gula seperti apa yang cocok untuk memproduksi EPS dalam jumlah banyak. Suhu juga merupakan faktor utama dalam produksi EPS, dan suhu yang terbaik bagi *Lactobacillus casei* adalah 30°C [14], sedangkan dalam penelitian dari isolat susu suhu yang digunakan adalah 37°C [15].

## SIMPULAN

Hasil isolasi bakteri asam laktat dari kimchi diperoleh 9 isolat yaitu A.2.1, A.2.2, A.4.1, A.4.2, A.4.3, B.2.1, B.2.2, B.3.1, dan B.4.1. Kesembilan isolat ini memiliki ciri-ciri morfologi berbentuk basil atau batang, gram positif, katalase negatif, tidak memproduksi gas, dan kecepatan pengasaman lambat.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa jumlah produksi EPS pada media MRS Broth dari isolat BAL yang diperoleh dari kimchi berkisar antara 99-427 mg/L. Dari 9 isolat, hanya isolat A.2.2 yang tidak mampu memproduksi EPS dari isolat kontrol yaitu *Lactobacillus casei* (106,33 mg/L). Isolat yang mampu memproduksi EPS tertinggi adalah isolat B.3.1 (427 mg/L).

Jumlah produksi EPS dari isolat kimchi berbeda satu sama lain, karena terpengaruh dari sifat genetik yang merupakan suatu sifat yang diturunkan dari masing-masing spesies

dan dipengaruhi oleh susunan gen. Faktor kedua merupakan faktor fenotif yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dari tempat pertumbuhan bakteri.

#### DAFTAR PUSTAKA

- 1) Malik, Amalia, Donna M. Ariesranti, Anandayu Nurfachtiyanti, dan Arry Yanuar. 2008. Skrining Gen Glukosiltransferase (*GTF*) Dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. 2003. *Makara Sains*, Volume 12, No. 1, April 2008:1-6
- 2) Stamer, J.R. 1979. The Lactic Acid Bacteria. *Microbes of Diversity. J. Food Technol.* 1: 60 - 65.
- 3) Lim, C.R., Park, H.K., Han, H.U., 1989. Reevaluation of isolation and identification of gram-positive bacteria in kimchi. *Korean J. Microbiol.* 27, 404– 413 (in Korean).
- 4) Amalia, Ratih Dwi. 2012. Eksplorasi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Sawi Asin (*Brassica juncea*). Skripsi. Universitas Brawijaya : Malang.
- 5) Tabucanon, M. 1998. Multiple Criteria Decision Making In Industry. Elsevier Science Publisher. NewYork.
- 6) Purwohadisantoso, K. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Sayur kubis Yang Memiliki Kemampuan Penghambatan Terhadap Bakteri Patogen. Skripsi. Universitas Brawijaya : Malang
- 7) Tallon, R., P. Bressollier and M.C. Urdaci. 2006. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. <http://pasteur.fontismedia.com/infiles.doc>. Diakses tanggal 25 November 2012
- 8) Seely, H. W., P.W. Vanden Mark and J.J. Lee. 2001. *Microbes in Action. A laboratory Manual of Microbiology.* 4 edition. W.H. Freeman and Comp. New York p.265-266 [9] AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of The Association of Analytical Chemist.* Washington D.C
- 9) Vijayabaskar, P.; Babinastarlin, S.; Shankar, T. et al. (2011). Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC121). *Adv. Biolog. Res.*, 62, 71-76. [11] Godow, A V., C.F. Hansman and E. Joubet. 1997. Comparison of the Antioksidant Activity of A Spalathin with Other Plant Phenol of Roubos Tea of *Aspalathus linieris*,  $\alpha$ -tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric Food Chem* 45 (3) : 632-638
- 10) Halim, Christine Natalia. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). SKRIPSI. Universitas Brawijaya : Malang
- 11) Harrah, T., B. Panilaitis and D. Kaplan. 2006. Microbial Exopolysaccharides. <http://www.jds.fass.org/cgi/content/full.html>. Diakses Tanggal 1 Desember 2011
- 12) Cerning J, Bouillanne C, Landon M, and Desmazeaud M. 1994. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Station de recherches laitières, INRA,CRJ,Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France. Lait* (1995) 75, 463-472
- 13) Badel S, Bernardi T, Michaud P (2011) *Biotechnology Advances* 29 (1): 54-64
- 14) Sujaya, I Nengah, Ni Putu Desy Aryantini, Ni Wayan Nursini, Cok. Istri Dewiyani Cakrawati, Ni Luh Made Ema Juliasari, Ni Made Utami Dwipayanti, dan Yan Ramona. 2012. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus* sp. Isolat Susu Kuda Sumbawa dan Potensinya sebagai Prebiotik. *Jurnal Veteriner* Juni 2012. ISSN ; 1411 – 8327. Vol. 13 No. 2 : 136-144