

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT BERPOTENSI PROBIOTIK DARI DANGKE SUSU SAPI DI KABUPATEN ENREKANG

Fatmawati Nur¹⁾, Hafsan²⁾, Dewi Paramitasari³⁾

Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

ABSTRAK

Penelitian ini merupakan studi awal untuk mengeksplorasi potensi probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) dari dangke, makanan tradisional dari susu sapi di kabupaten Enrekang. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup memberikan manfaat kesehatan pada inangnya. Salah satu mikroorganisme yang berpotensi menjadi probiotik adalah bakteri asam laktat yang banyak ditemukan pada susu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bakteri asam laktat yang terdapat pada dangke dengan bahan dasar susu sapi. Isolasi BAL menggunakan media selektif de Man Rogosa Sharpe Agar. BAL akan menunjukkan zona bening pada medium MRS setelah penambahan indikator CaCO_3 dan diinkubasi selama 24 jam. Seleksi dilakukan dengan mengamati morfologi sel, pewarnaan Gram, dan uji biokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh terdiri dari dua spesies yaitu *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus acidophilus* yang menunjukkan gram positif dan katalase negatif.

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat, Dangke, Susu Sapi, Probiotik.

ABSTRACT

This research is a preliminary study to explore potential probiotics of Lactic Acid Bacteria (LAB) in dangke, a traditional food from cow milk in district of Enrekang. Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. One potentially probiotic microorganisms are lactic acid bacteria that are found in milk. This research aims to determine the lactic acid bacteria contained in dangke with cow dairy ingredients. Isolation of LAB performed using the selective medium de Man Rogosa Sharpe Agar. LAB will show clear zone on MRS medium after the addition of the indicator in the form of CaCO_3 and incubated for 24 hours. Selection is done by observing the cell morphology, Gram staining, and biochemical test. The results showed that lactic acid bacteria isolates obtained consists from two of whom are the LAB *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus acidophilus* that showed gram positive and catalase negative.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Dangke, Cow Milk, Probiotic

PENDAHULUAN

Dewasa ini di negara yang sudah maju maupun di negara yang sedang berkembang termasuk di Indonesia, sapi perah merupakan sumber utama penghasil susu yang mengandung nutrisi tinggi. Walaupun ada susu yang

dihasilkan oleh ternak lain misalnya kerbau, kambing, kuda dan domba, akan tetapi penggunaannya di masyarakat tidak sepopuler susu sapi perah. Susu sapi merupakan sumber protein hewani yang sangat penting bagi tubuh manusia, karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap dan seimbang.

Dalam rangka ketahanan pangan dan diversifikasi konsumsi pangan, peran pangan lokal sangat strategis dan penting sehingga perlu dilestarikan eksistensinya. Salah satu pangan lokal di Sulawesi Selatan yang khas adalah Dangke. Panganan ini dikonsumsi oleh sebagian besar masyarakat Sulawesi Selatan khususnya di kabupaten Enrekang.

Dangke telah dikenal sejak 1905, saat masih dalam masa penjajahan Belanda. Konon, kata dangke ini adalah hasil percakapan peternak dan Pastor Belanda dengan peternak kerbau pembuat dangke, si peternak memberi dangke, lalu sang pastor berkata *dangk U* (terima kasih dalam bahasa Belanda). Sedangkan ucapan terima kasih dalam kosa kata Jerman dikenal '*Danke*', sedikit mirip dengan dangke (Nurani, 2012).

Pengolahan susu sudah lama diupayakan seperti susu fermentasi yaitu yoghurt, yakult, keir, mentega, keju dan sebagainya. Produk susu fermentasi cukup beragam rasanya sesuai dengan negara asalnya, jenis bakteri starter dan jenis susu yang digunakan. Di Indonesia ada susu fermentasi khas asal Sulawesi Selatan yakni tepatnya pada kabupaten Enrekang yaitu dangke. Dangke ini dapat dibuat dengan bahan dasar berupa susu sapi maupun susu kerbau yang selanjutnya diemulsikan dengan menggunakan enzim papain.

Dangke diolah dari susu sapi atau susu kerbau yang dipanaskan dengan api kecil sampai hampir mendidih, kemudian ditambahkan koagulan berupa getah buah pepaya sehingga terjadi penggumpalan. Setelah terjadi pemisahan antara gumpalan dan cairan berwarna kuning, gumpalan tersebut dimasukkan ke dalam cetakan khusus yang terbuat dari tempurung kelapa sambil ditekan-tekan supaya cairannya terpisah. Susu sebagai bahan baku utama pembuatan dangke merupakan sumber protein hewani yang sangat penting bagi tubuh manusia, karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap dan seimbang (Isyana 2011, 6).

Pembuatan dangke dilakukan dengan merebus campuran susu sapi, garam dan getah pepaya atau sari buah pepaya muda. Pada getah pepaya ini memiliki kandungan enzim-enzim protease yaitu papain dan kimopapain yang berfungsi sebagai pengurai protein. Dangke terkenal memiliki kandungan protein betakaroten yang cukup tinggi (Nurani, 2012).

Semua enzim mempunyai kekhususan sifat atau spesifikasi terhadap zat yang disebut substrat, contohnya proteolitik seperti bromelin dari sari nenas, papain dari pepaya dan renin dari lambung anak sapi yang dapat menguraikan protein. Dalam proses pembuatan dangke secara tradisional menggunakan Papain Kasar. Penggunaan papain banyak dilakukan untuk berbagai tujuan antara lain sebagai bahan penggumpal susu serta untuk melunakkan daging. Secara umum yang dimaksud dengan papain

adalah papain yang telah dimurnikan maupun yang masih kasar (Aras, 2010). Beberapa enzim dalam susu yang penting termasuk dalam kelompok enzim oksidase, transferase, dan hidrolase. Fungsi utama suatu enzim ialah mengurangi hambatan energi aktivasi pada suatu reaksi kimiawi (Pelczar *et al.* 1986, 324).

Konsentrasi ion hidrogen (yaitu keasaman dan kebasaan) larutan sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Hal ini disebabkan karena asam amino yang merupakan pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif (Volk *et al.* 1993, 76).

Dalam proses pembuatan dangke, suhu pemanasan dan penggunaan konsentrasi papain kasar berperan dalam menentukan lamanya proses dan mempengaruhi jenis dangke yang terbentuk. Berdasarkan hal tersebut maka dianggap perlu mengkaji mengenai penggunaan papain kasar dan suhu pemanasan dalam pembuatan dangke, dengan tujuan untuk mengetahui kadar papain kasar dan suhu pemanasan yang tepat dalam pembuatan dangke (Aras, 2010).

Susu merupakan bahan pangan yang mempunyai nilai gizi tinggi karena mempunyai kandungan nutrisi yang lengkap antara lain lemak, protein, laktosa, vitamin, mineral, dan enzim. Di dalam susu terkandung vitamin B2 dan vitamin A, selain protein juga terdapat macam-macam asam amino yang penting untuk pertumbuhan tubuh. Sekarang, susu sapi dijuluki sebagai bahan makanan dengan kandungan vitamin lengkap, juga sebagai “darah putih” yang membantu kesehatan tubuh manusia (Herbal, 2012).

Susu pada umumnya mudah dan cepat rusak, karena mengandung protein, lemak, mineral, air yang mudah bereaksi, terdegradasi, mendorong aktivitas enzim serta merupakan media yang baik untuk perkembangan mikroba, terutama pada kondisi lingkungan dengan suhu dan kelembaban tinggi. Oleh sebab itu teknologi pascapanen sebagai suatu inovasi, mulai dari pemerahan, penanganan, pengolahan, pengemasan, penyimpanan dan pengawetan hingga transportasi sangat menentukan tingkat kerusakan, mutu dan nilai ekonomi susu sapi segar (Abubakar, 2012).

Syarat kualitas air susu segar di Indonesia telah dibakukan dalam Standart Nasional Indonesia (SNI 01-3141-1997), dimana pemeriksaan cemaran mikroba dalam air susu segar meliputi uji pemeriksaan dengan angka lempeng total (batas maksimum mikroba $3,0 \times 10^6$ koloni/ml), *Escherichia coli* (maksimum 10/ml), *Salmonella* (tidak ada), *Staphylococcus aureus* (maksimum 10^2 koloni/ml) (Utami, 2012).

Selain kemungkinan terdapatnya cemaran mikroba, secara alami susu juga mengandung mikroorganisme kurang dari 5×10^3 per ml jika diperah dengan cara yang benar dan berasal dari sapi yang sehat (Jay 1996, 469–471). Bakteri yang terdapat secara alami di dalam tubuh mahluk hidup disebut flora normal yang merupakan bakteri baik dan pada umumnya berpotensi sebagai probiotik.

Istilah bakteri asam laktat (BAL) mulanya ditujukan hanya untuk sekelompok bakteri yang menyebabkan keasaman pada susu (*milk-souring organisms*). Secara

umum BAL didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat. Bakteri asam laktat (BAL) secara fisiologi dikelompokkan sebagai bakteri Gram positif, bentuk kokkus atau batang yang tidak berspora dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Secara tradisional, BAL terdiri dari empat genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus* (Susanto, 2012).

Bakteri asam laktat (BAL) dikategorikan sebagai *foodgrade microorganism* karena bersifat non-patogen dan aman bagi manusia. Perannya pada bidang pangan sudah sangat luas terutama pada processing makanan seperti fermentasi susu, daging dan sayuran. Bakteri asam laktat dengan aktivitas probiotik berperan mengatur ekosistem saluran pencernaan. Jumlah sel bakteri hidup yang harus terdapat dalam produk probiotik dan dapat memberi manfaat kesehatan umumnya berkisar 10^6 - 10^8 cfu/g (Tannock 1999, 5-14), atau 10^7 - 10^8 cfu/g produk (Charterist *et al.* 1998, 123-135).

Bakteri probiotik adalah bakteri yang dapat meningkatkan kesehatan manusia. Bakteri probiotik mampu bertahan hidup selama pengolahan, penyimpanan dan di dalam ekosistem saluran pencernaan, meskipun terdapat berbagai rintangan seperti air liur, asam lambung dan asam empedu. Selain itu bakteri probiotik dapat berkembang biak, tidak beracun serta tidak patogen (Sunarlim 2009, 71).

Beberapa syarat mikroba sebagai probiotik antara lain stabil terhadap pH rendah asam lambung dan garam empedu. Waktu yang diperlukan saat bakteri mulai masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit, maka kultur digolongkan probiotik bila mampu bertahan dalam kondisi asam lambung selama sedikitnya 90 menit (Chou 1999, 23-31). Mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam MRSA+0,3% oxgal, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu (Zavaglia *et al.* 1998, 865-873).

Bakteri probiotik yang sudah melalui uji klinis, diantaranya adalah *Lactobacillus casei*. *casei* Shirota strain yang terdapat dalam yakult, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. helveticus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis* dan *Enterococcus faecium*, *E. Faecalis* (Saputro 2008, 15).

Besarnya kemungkinan flora alami yang memiliki potensi sebagai bakteri baik misalnya bakteri probiotik yang menguntungkan bagi kesehatan tumbuh dan berkembang biak pada dangke yang berbahan dasar susu menjadi landasan dilakukannya penelitian ini.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat yang terdapat pada dangke dengan bahan dasar susu sapi.

METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain oven, autoklaf, botol, lemari es, tempurung kelapa, sendok, botol pengenceran, cawan petri, inkubator, labu Erlenmeyer, gelas piala, laminar air flow, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, bunsen, gelas objek, deck glass, colony counter, korek api, mikropipet dan tip, water bath, vortex, pH indikator, mikroskop, neraca analitik, spatula, gelas objek, tabung reaksi, kertas label dan spoit.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air suling, susu sapi segar, getah pepaya (papain), medium pertumbuhan (PCA, MRS broth dan agar, Pepton Water), *Nutrient Agar* (NA), larutan fisiologis (NaCl 0,9%), CaCO₃ 1%, medium pewarnaan Gram (alkohol 96%, kristal violet, Iodium, Safranin), medium pengujian aktivitas biokimia (uji KIA, uji motility, reagen Ehrlich, reagen kovac, uji Metil Red, uji Voges Proskauer, alfa-naftol, KOH, uji sitrat, uji urea, medium uji karbohidrat (glukosa, lactosa, sukrosa, maltosa, manitol dan malonat), uji katalase, H₂O₂).

Penelitian ini terdiri atas tahapan-tahapan sebagai berikut: tahap persiapan, isolasi bakteri dari dangke, karakterisasi bakteri secara mikrobiologis dan biokimia.

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih lalu dibilas dengan air suling, kemudian alat-alat gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan lampu spiritus.

b. Pembuatan Medium

Bahan-bahan yang akan digunakan disiapkan untuk pembuatan masing-masing medium seperti MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*) broth dan agar untuk bakteri gram positif, *Nutrient Agar* (NA) dan Pepton Water untuk bakteri gram negatif, dan medium pengujian aktivitas biokimia. Bahan tersebut ditimbang sesuai dengan komposisi masing-masing medium yang akan dibuat, kemudian dilarutkan dengan air suling steril, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada tekanan atmosfer 2 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah disterilkan diletakkan pada ruangan steril selama 2 hari.

c. Pembuatan Dangke dan Preparasi Sampel

1) Pembuatan Dangke

Susu sapi segar dipanaskan dengan api kecil sampai mendidih (suhu 70°C) selama 20 menit, kemudian ditambahkan koagulan berupa getah pepaya sebanyak 5 ml untuk 5 liter susu sapi sehingga terjadi penggumpalan. Gumpalan tersebut dimasukkan ke dalam cetakan khusus yang terbuat dari tempurung kelapa sambil ditekan sehingga cairannya keluar melalui lubang pada cetakan.

2) Preparasi Sampel Dangke

Sebanyak 10 gram dangke disuspensikan ke dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%) steril sebanyak 90 ml dan dihomogenkan. Dari suspensi tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung pengencer yang berisi 9 ml aquades steril, dihomogenkan menghasilkan pengenceran 10^{-1} , pengenceran dilanjutkan hingga pengenceran 10^{-3} .

3) Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Dangke

Suspensi Dangke diinokulasikan pada medium cair MRS Broth dan Pepton Water diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Kultur dari MRS Broth diinokulasikan pada medium MRSA lalu ditambahkan CaCO_3 1%, diinkubasi selama 48 jam. Koloni yang di sekitarnya terbentuk zona bening dimurnikan kembali pada medium MRSA dengan metode goresan sinambung lalu diinkubasi selama 24 – 48 jam. Penanaman dilakukan berulang-ulang pada medium dan kondisi yang sama hingga didapatkan koloni tunggal. Isolat murni tersebut lalu dipindahkan pada agar miring sebagai stok, disimpan di *refrigerator* pada suhu 4°C .

2. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

a. Identifikasi Morfologi Secara Mikroskopik dengan Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 96% kemudian difiksasi di atas lampu spiritus, selanjutnya isolat aktif diambil secara aseptik dan diletakkan di atas gelas objek lalu diratakan. Difiksasi kembali di atas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan cat Gram A (kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Setelah itu ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1` menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Kemudian ditetesi dengan Gram C (Alkohol 96 %) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Terakhir ditetesi dengan Gram D (Safranin) selama 45 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan kertas serap. Pengamatan ini dilakukan dengan melihat bentuk dan warna sel dibawah mikroskop dengan pembesaran tertentu.

b. Pengujian Aktivitas Biokimia

Aktivitas biokimia atau metabolisme adalah berbagai reaksi kimia yang berlangsung dalam tubuh makhluk hidup untuk mempertahankan hidup.

1. Uji KIA

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada permukaan agar miring dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

2. Uji Motility

Isolat murni diambil sebanyak satu ose ditusuk hingga pertengahan medium untuk melihat sifat motil dari mikroba tersebut dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

3. Uji Metil Red

Isolat murni diambil sebanyak satu ose dimasukkan kedalam medium dan di

homogenkan setelah itu di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dan ditambahkan metil red.

4. Uji Voges Proskauer

Isolat murni diambil sebanyak satu ose dimasukkan kedalam medium dan di homogenkan. Di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam kemudian di tambahkan pereaksi alfa-naftol dan KOH.

5. Uji Citrat

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada medium agar miring untuk uji citrat dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

6. Uji Urea

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada medium agar miring untuk uji urea dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

7. Uji Karbohidrat

Pada uji karbohidrat ini terdiri dari beberapa medium yaitu glukosa, lactosa, sukrosa, maltosa, manitol dan malonat. Pada setiap medium dimasukkan isolat murni sebanyak satu ose dan di homogenkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

8. Uji Katalase

Isolat murni diletakkan di atas gelas objek kemudian di tetesi dengan H₂O₂, diamati ada tidaknya gelembung gas yang dihasilkan.

HASIL PENELITIAN

1. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Dangke

Sebanyak lima isolat bakteri telah diisolasi dari dangke susu sapi dengan menggunakan media MRSA secara *pour plate* selama 1 x 24 jam masa inkubasi pada suhu 37°C. Lima isolat tersebut diberi kode masing-masing A, B, C, D dan E dengan ciri morfologi koloni yang berbeda satu sama lain (lampiran V). Dari kelima isolat tersebut, dua diantaranya (A dan B) merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang ditandai oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada media MRSA yang ditambahkan dengan 1% larutan CaCO₃. Untuk memastikan bahwa dua isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat, isolat tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *quadrant streak* pada media MRSA yang telah ditambah dengan BCP (*bromcresol purple*) kemudian diinkubasi kembali selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Koloni murni yang telah diperoleh ditumbuhkan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring dan dipakai sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya.

2. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Dua isolat terpilih yang mampu tumbuh pada media MRSA yang telah ditambahkan dengan BCP selanjutnya diamati bentuk selnya dan diuji secara biokimiawi untuk kepentingan karakterisasi dan identifikasi. Adapun uji biokimia yang dilakukan adalah uji KIA, motilitas, katalase, serta uji karbohidrat (glukosa, laktosa,

sukrosa, maltosa, manitol dan malonat) sebagaimana terlihat pada Table 1.

Tabel 1. Karakterisasi dan identifikasi bakteri asam laktat

Uji Biokimia	Isolat Bakteri			
	A	B	C	D
Pewarnaan Gram	Basil Gram Positif	Basil Gram Positif	Basil Gram Positif	Basil Gram Positif
Katalase	-	-	-	-
KIA	A/A, -/-	A/A, -/-	A/A, -/-	A/A, -/-
Urea	-	-	-	-
S. Citrat	-	-	-	-
LIA	-	-	-	-
MIO	-/ /-	-/ /-	-/ /-	-/ /-
Glukosa	+	+	+	+
Laktosa	-	+	-	-
Sukrosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-
Malonat	-	-	-	-
Species	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>

PEMBAHASAN

1. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Dangke

Empat isolat yang diperoleh dari dangke susu sapi menunjukkan morfologi koloni yang berbeda yang meliputi bentuk, tepi, elevasi dan warna. Morfologi Koloni yang berbeda tersebut menjadi dasar atas asumsi bahwa keempat isolat tersebut adalah jenis bakteri yang berbeda (Whitman, 2009). Setelah dilakukan pemurnian atas keempat isolat dan dilakukan skrining dengan menggunakan media MRSA yang ditambahkan 1% CaCO₃ sebagai medium yang digunakan untuk menyeleksi bakteri asam laktat. Penambahan CaCO₃ pada media dimaksudkan untuk seleksi bakteri asam laktat karena bakteri asam laktat yang tumbuh pada media akan memberikan zona bening di sekitar koloni setelah inkubasi 2-3 hari karena dhasilkannya asam laktat yang akan bereaksi dengan CaCO₃ membentuk Ca-laktat yang larut dalam media (Djide *et al.* 2008, 74). Dua dari empat isolat yang berhasil diperoleh dari dangke susu sapi memiliki kemampuan untuk menurunkan nilai pH medium dengan memproduksi asam yang ditandai terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat (Garver dan Muriana, 1993).

Kedua isolat terpilih masing-masing isolat A dan B. Isolat A memiliki koloni kecil berbentuk bulat, elevasi cembung, tepi rata, permukaan berkilau, warna putih susu. Sedangkan isolat B menunjukkan morfologi koloni yang sangat mirip dengan isolat A, yaitu berbentuk bulat, elevasi cembung, tepi rata, permukaan berkilau, warna putih susu. Perbedaannya dengan isolat A terletak pada ukuran koloni yang lebih besar. Firman (2009), menyatakan koloni *Lactobacillus* yang ditumbuhkan pada media agar umumnya berukuran 2-5 mm, dengan permukaan cembung, entire, buram, dan berwarna putih susu. Hal tersebut mempertegas bahwa isolat A dan B merupakan bakteri asam laktat.

2. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi genera bakteri asam laktat memerlukan karakter-karakter utama dari bakteri yaitu morfologi sel (bentuk sel dan susunan sel), uji biokimia, dan, tipe fermentasi. Menurut Margiono dan Rahayu (1997) uji morfologi dan uji tipe fermentasi sudah dapat dilakukan identifikasi ke tingkat genera bakteri asam laktat. Bentuk sel bakteri isolat A adalah batang panjang, sedangkan isolat B berbentuk batang yang lebih pendek. Kedua isolat merupakan Gram positif, artinya bakteri tersebut memberi respon berwarna biru keunguan jika dilakukan uji pewarnaan Gram. Terbentuknya warna biru/ungu pada bakteri Gram positif disebabkan karena komponen utama penyusun dinding sel bakteri Gram positif adalah peptidoglikan, sehingga mampu mengikat cat kristal violet. Bakteri asam laktat termasuk dalam golongan bakteri Gram positif (Stamer, 1979).

Perbedaan penyerapan warna ini disebabkan oleh perbedaan peptidoglikan dan permeabilitas membran organisme gram positif dengan gram negatif dimana permeabilitas membran organisme gram positif memiliki dinding sel peptidoglikan yang cukup tebal dibandingkan gram negatif, organisme gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan (Unus, 2005).

Motilitas bakteri isolat A dan B diuji dengan menusukkan isolat medium MIO agar tegak. Pada uji ini pertumbuhan bakteri hanya pada bekas tusukan menunjukkan hasil negatif, karena pertumbuhannya tidak menyebabkan kekeruhan sebagian besar dari medium dari warna dasar media yaitu ungu. Berdasarkan uji tersebut maka kedua isolat bakteri dinyatakan bersifat non-motil.

Sebagian besar bakteri asam laktat dapat tumbuh sama baiknya di lingkungan yang memiliki dan tidak memiliki O_2 (tidak sensitif terhadap O_2), sehingga termasuk anaerob aerotoleran/fakultatif anaerob. Demikian halnya dengan isolat A dan B. Hal ini ditunjukkan dengan kemampuan kedua isolat tumbuh pada kondisi inkubasi aerob (dengan inkubator) maupun anaerob (dengan *candle jar*). Menurut Holt et al, (1994), bakteri *Lactobacillus* termasuk Gram positif, tidak berspora, tidak motil, fakultatif anaerob.

Menurut Stamer (1979) bakteri asam laktat ada yang homofermentatif dan heterofermentatif. Isolat A merupakan bakteri asam laktat yang bersifat

heterofermentatif yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham pada pengujian produksi gas, berarti bakteri tersebut mampu memecah glukosa menjadi asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetaldehid, diasetil melalui jalur oksidatif pentosa fosfat dengan bantuan enzim fosfoketolase. Isolat B bersifat homofermentatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham saat kultivasi di medium glukosa selama 1 x 24 jam. Hal ini berarti isolate A dapat memecah glukosa menjadi asam laktat sebagai produk utama melalui jalur *Embden-Meyerhorf-Parnas* (EMP) atau glikolisis. Enzim yang berperan dalam tahap glikolisis adalah enzim aldolase dan heksosa isomerase.

Kelompok bakteri homofermentatif (homolaktat fermentatif) memproduksi 2 molekul asam laktat dari 1 molekul glukosa atau memproduksi asam laktat hampir 90%, sedangkan kelompok heterofermentatif hanya memproduksi 1 molekul asam laktat, etanol dan CO₂ dari 1 molekul glukosa (Fung, 1986 ; Schlegel 1994). Bakteri homofermentatif dapat menghasilkan energi sebesar dua kali energi yang dihasilkan oleh bakteri heterofermentatif dari sejumlah substrat yang sama (Fardiaz 1988).

Menurut Stamer (1979), bakteri asam laktat termasuk bakteri katalase negatif. Isolat yang diperoleh dari dangke susu sapi memiliki sifat katalase negatif yang ditunjukkan oleh tidak terbentuknya gelembung udara yang berarti tidak terbentuk gas pada reaksi uji katalase. Hal ini berarti bakteri tersebut tidak mampu menghasilkan enzim katalase untuk memecah H₂O₂. Berdasarkan Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology, kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang yang mempunyai katalase negatif dan hasil pengecatan Gram bersifat positif merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* (Whitman, 2009).

Uji karbohidrat terhadap dua isolate terpilih terdiri dari beberapa medium yaitu glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol dan malonat. Pembentukan gula-gula yang digunakan adalah cair yang mengandung satu jenis karbohidrat (kadar 1%) dengan indikator *phenol red*. Jika, terjadi fermentasi, medium terlihat berwarna kuning karena perubahan pH menjadi asam. Terjadinya warna kuning pada medium berarti tes positif dari warna dasar media yaitu merah. Setelah melakukan uji terhadap isolate bakteri terlihat bahwa terjadinya perubahan warna pada media yang menandakan bahwa bakteri tersebut mampu memfermentasikan glukosa.

Isolat A menunjukkan hasil uji fermentasi gula glukosa, sukrosa, serta maltose yang menunjukkan hasil positif, sedangkan uji laktosa dan manitol dan malonat menunjukkan reaksi negatif. Isolat B menunjukkan reaksi positif atas uji glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose, dan menunjukkan reaksi negatif atas uji manitol malonat.

Berdasarkan hasil dari rangkaian uji biokimia yang menunjang pengamatan morfologi koloni dan sel atas dua isolate dari dangke susu sapi, maka dapat dinyatakan bahwa isolate A dan B merupakan bakteri asam laktat masing-masing sebagai *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus acidophilus*.

Lactobacillus fermentum termasuk dalam golongan Gram positif dengan sel

batang nonmotil (ketebalan 0,5-0,9 μ m dan panjang yang sangat bervariasi), tidak menghasilkan katalase, serta merupakan obligat heterofermentatif. Bakteri ini dapat diisolasi dari ragi, produk susu, fermentasi bahan tumbuhan, pupuk, limbah dan kotoran hewan dan atau manusia. Bakteri *L. fermentum* tergolong bakteri mesofilik dengan kisaran suhu optimum 35-45 $^{\circ}$ C, pH 4- 5,5, tidak tumbuh pada pH di atas 6. Bakteri ini tergolong obligat heterofermentatif karena menghasilkan asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetaldehid, dan diasetil. Keuntungan lain *L. fermentum* menghasilkan enzim yang mengubah glukosa atau laktosa selain membentuk asam laktat, disamping itu aktivitas enzim proteolitiknya lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya, sehingga sangat potensial dimanfaatkan dalam proses fermentasi. Selain itu produk yang dihasilkan dari fermentasi oleh bakteri ini memiliki cita rasa dan nilai gizi yang tinggi (Holt *et al.*, 1994). *L. fermentum* termasuk kingdom Bacteria, divisi Firmicutes, kelas bacilli, ordo Lactobacillales, family Lactobacillaceae, Genus Lactobacillus (Whitman, 2009).

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri dari famili *Lactobacillaceae* yang termasuk dalam golongan Gram positif, berbentuk batang, bersifat mesofilik dan tidak dapat membentuk spora. Bakteri *L. acidophilus* bersifat homofermentatif dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat (Rahman *et al.*, 1992). Saat ini telah diketahui bahwa keberadaan bakteri ini tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan sehingga sering digunakan dalam industri pengawetan makanan, minuman dan berpotensi sebagai produk probiotik. Sifat yang menguntungkan dari bakteri *Lactobacillus* dalam bentuk probiotik adalah dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. Bakteri tersebut berperan sebagai flora normal dalam sistem pencernaan yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan (Hardiningsih, 2006).

Karakteristik *L. acidophilus* adalah: (1) tidak tumbuh pada suhu 15 $^{\circ}$ C dan tidak memfermentasi ribosa; (2) pertumbuhan optimum pada suhu 35-38 $^{\circ}$ C dan pH optimum 5,5-6,0; (3) pada susu sapi memproduksi 0,30%-1,90% DL asam laktat (Nakazawa dan Hosono, 1992). Berdasarkan uji biokimia pada bakteri *L. acidophilus* diperoleh hasil negatif terhadap uji katalase, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *L. acidophilus* tersebut tidak memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim katalase. Whitman (2009), *L. acidophilus* termasuk kingdom Bacteria, divisi Firmicutes, kelas bacilli, ordo Lactobacillales, family Lactobacillaceae, Genus Lactobacillus.

Bakteri *L. acidophilus* merupakan salah satu spesies penyusun mikroflora alami usus yang mampu melewati hambatan di dalam saluran pencernaan. Spesies ini resisten terhadap enzim dalam saliva, asam lambung dan asam empedu sehingga mampu mencapai usus dalam keadaan hidup. Bakteri *L. acidophilus* banyak ditemukan pada bagian akhir usus halus dan bagian awal usus besar. Bakteri ini mampu memproduksi berbagai zat metabolit, seperti : asam organik, hidrogen peroksida dan berbagai bakteriosin yang dapat menghambat perkembangan bakteri patogen (Kanbe, 1992).

Bakteri *L. acidophilus* membantu mengendalikan infeksi dan peradangan usus, dengan fungsi tersebut maka mengurangi potensi diare, serta mampu menghalangi terbentuknya kanker dan membantu mengendalikan kadar kolesterol darah (Wahyudi dan Samsundari, 2008).

Beberapa persyaratan yang diperlukan untuk menjadikan strain bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik adalah bahwa strain tersebut merupakan mikroflora alami jalur pencernaan manusia, tumbuh dan tetap hidup pada makanan sebelum dikonsumsi, tetap hidup walaupun melewati jalur pencernaan, memiliki resistensi terhadap asam lambung, beberapa antibiotik, terhadap lisosim, dapat tumbuh pada intestin dan memiliki kemampuan menempel pada sel epitel intestin manusia, memberi efek yang menguntungkan pada usus, memproduksi asam dalam jumlah besar dan cepat, mampu menghasilkan komponen antimikrobia lain di samping asam (bakteriosin, hidrogen peroksida, diasetil dan reuterin) yang efektif menghambat bakteri lain yang tidak dikehendaki, khususnya bakteri patogen (Rahayu, 2002).

Pada dasarnya penelitian tentang BAL pada dangke masih sangat minim dilakukan. Satu-satunya publikasi ilmiah yang ditemukan adalah isolasi bakteri dari dangke yang menghasilkan 30 isolat bakteri, 3 diantaranya berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba. *Enterococcus faecium* DU55 merupakan salah satu isolat yang dapat digunakan untuk memproduksi zat antimikroba bakteriosin yang diujikan pada kondisi optimum fermentasi berupa suhu, waktu, dan komposisi medium fermentasi (Razak *et al.*, 2009, 1-9).

Bakteri asam laktat dalam pemanfaatannya dalam pengawetan dan produksi makanan sehat sangatlah diperlukan. Menurut Mahmud (2007) penelitian modern menemukan bagian-bagian dan peran vital yang dapat diperankan oleh mikroba yang baik bagi kehidupan, kesehatan dan kesejahteraan manusia. Ilmu pengetahuan dan teknologi yang terus melaju dengan pesat memberikan dampak yang jelas terhadap produk makanan. Bisa saja suatu produk dinyatakan halal pada saat ini, tetapi beberapa tahun kemudian menjadi tidak halal lagi karena bahan baku yang sama telah berubah proses pembuatannya sehingga menjadikannya sebagai produk yang meragukan.

Di satu sisi, para ahli syariah Islam mungkin belum seluruhnya menyadari betapa kompleksnya produk pangan dewasa ini dimana asal usul bahan bisa melalui jalur yang berliku-liku, banyak jalur, bahkan dalam beberapa kasus, sulit ditentukan asal bahannya. Dengan demikian, penentuan kehalalan suatu produk menjadi tidak mudah, memerlukan peran ilmuwan untuk menelusuri asal usul bahan dan proses pembuatannya. Di sisi lain, pemahaman para ilmuwan terhadap syariah Islam, ushul fiqih dan metodologi penentuan haramnya suatu bahan pangan dari sisi syariah, relatif minimal. Akibatnya, sering terjadi perbedaan pandangan dalam menentukan kehalalan produk pangan (Rachman, 2002).

PENUTUP

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada dangke berbahan dasar susu sapi terdapat bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet, G.H. dan Wootton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Haripurnomo dan Adino. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Chou, L.Z. and B. Weimer. 1999. *Isolation and Characterization Of Acid and Bile-Tolerant Isolates From Strains Of Lactobacillus Acidophilus*. J. Dairy Sci. 82: 23-31.
- Charterist, W.P., P.M. Kelly, L. Morelli and J.K. Collins. 1998. *Ingredient Selection Criteria For Probiotic Microorganism In Functional Dairy Food*. Int. J. Dairy Tech. 51: 123-135.
- Djide MN dan Wahyudin E. 2008. *Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu, dan Potensinya dalam Penurunan Kadar Kolesterol Secara In Vitro*. Majalah farmasi dan Farmakologi; 12(3):73-78.
- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Djambatan.
- Fung, D.Y.C. 1986. Types of microorganisms. ch.2. Di dalam:Cunningham, F.E. & Cox, N.A. *The Microbiology of Poultry Meat Product*. New York: Academic Press Inc.
- Garver KI, Muriana PM. 1993. *Detection, Identification, and Characterization of Bacteriocin Producing lactic Acid Bacteria from Retail Food Products*. Int J Food. Micro-biol. 19: 241-258
- Gibson, G.R. and Fuller. 2000. *Aspect Of In Vitro and In Vivo Research Directed Toward Identifying Probiotic and Prebiotic For Human Use*. J. Nutr.130 (25 suppl) : 3915-3955. In: Scientific press.
- Hadiwiyoto, S. 1994. *Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya*. Yogyakarta : Penerbit Liberty.
- Hardiningsih, R. dan N. Nurhidayat. 2006. *Pengaruh Pemberian Pakan Hiperkolesterolemia terhadap Bobot Badan Tikus Putih Wistar yang Diberi Bakteri Asam Laktat*. Biodiversitas. 7(2):127-130.
- Hidayat, Nur, Masdiana C. Palaga, dan Sri Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industry*. Yogyakarta : Andi.
- Holt. G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. & Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williamn and Wilkins Baltimore.
- _____. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 532.
- Irianto, Koes. 2006. *Mikrobiologi*. Bandung : Yrama Widya.

- Jay, M.J. 1996. *Modern Food Microbiology.Fifth Ed.* International Thomson Publishing, Chapman & Hall Book, Dept. BC. p.469–471.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg's. 2001. *Medical Microbiology.* Jakarta : Salemba Medica.
- Juffs, H and H. Deeth. 2007. *Scientific Evaluation of Pasteurisation for Pathogen Reduction in Milk and Milk Production.* Australia New Zealand : Food Standards. pp.. 84-85.
- Kanbe, M. 1992. *Traditional Fermented Milk of The Word.* In: Nakazawa, Y., and A. Husono (ed). *Function of Fermented Milk : Challenges for The Health Sciences.* Elsevier Science Publisher, England.
- Margino dan Rahayu, E.S. 1997. *Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi. Materi Workshop.* Seminar Makalah Tugas Akhir. PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Miskiyah, S. Usmiati dan Mulyorini. 2011. *Pengaruh Enzim Proteolitik dengan Bakteri Asam Laktat Probiotik terhadap Karakteristik Dadih Susu Sapi.* Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Buletin Peternakan Bogor. Vol. 35(2): 96-106.
- Nakazawa Y. & Hosono, A. 1992. *Function of fermented milk.* Challenges for The Health Sciences: 180-184S.
- Pelczar, J. Michael dan E.C.S Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi.* Terjemahan oleh ratna siri hadioetomo, teja imas, sutami tjitrosomo dan sri lestari angka. Jakarta : UI Press.
- Rahman, A. R, Abd. Rauf Patongb, Tjodi Harlimb, M. Natsir Djide, Haslia dan Mahdalia. 2012. *Produksi Senyawa Bakteriosin Secara Fermentasi Menggunakan Isolat BAL Enterococcus faecium DU55 Dari Dangke.* Jurnal Kimia. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Tadulako Palu.
- Rahman, A., D. Fardiaz, W.P. Rahayu, Suliantari dan C.C. Nurwitri. 1992. *Teknologi Fermentasi Susu.* Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahayu, E. S. 2002. *Lactic Acid Bacteria un Fermented Food of Indonesian Origin.* Jurnal Agritek.23 (23) :75 -84
- Razak AR, Patong AR, Harlim T, Djide MN, Haslia, Mahdalia. 2009. *Produksi Senyawa Bakteriosin Secara Fermentasi Menggunakan Isolat BAL Enterococcus faecium DU55 dari Dangke.* Indonesia Chemica Acta; 2(2):1-9.
- Sartika, Ratu Ayu Dewi, Yvonne M. Indrawani dan Trini Sudiarti. 2005. *Analisis Mikrobiologi Escherichia coli o157:h7 Pada Hasil Olahan Hewan Sapi Dalam Proses Produksinya.* Departemen Gizi Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia. Kesehatan Vol. 9, NO. 1: 23-28.
- Subandi. 2010. *Mikrobiologi Di Perguruan Tinggi Islam.* Bandung : Gunung Djati Press.

- Supardi, Imam dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan*. Bandung : Alumni.
- Sunarlim, Roswita. 2009. *Potensi Lactobacillus, sp Asal Dari Dadih Sebagai Starter Pada Pembuatan Susu Fermentasi Khas Indonesia*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Schlegel, H.G. 1994. *Mikrobiologi Umum Ed. Ke 6*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Stamer, J.R. 1979. *The Lactic Acid Bacteria*. Microbes of Diversity. *J. Food Technol.* 1: 60 – 65.
- Tannock, G.W. 1999. *Probiotic: A Critical Review*. England : Horizon Scientific Press.
- Volk, Wesley A dan Margaret F. Wheeler. 1993. *Basic Microbiology Fifth Edition*. Terjemahan: Markham. Jakarta: Erlangga.
- Wahyudi dan Samsudari. 2008. *Bugar Dengan Susu Fermentasi*. Malang : UMM Press.
- Winarno. 1993. *Pangan, Gizi, Teknologi dan Konsumen*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Whitman, William B. 2009. *Bergey's Manual Trust Department Of Microbiology Second Edition*. USA : University Of Georgia Athens.
- Zavaglia, A.G., G Kociubinski, P. Perez and G. De Antoni. 1998. *Isolation and Characterization Of Bifidobacterium Strains For Probiotic Formulation*. *J. Food Protect.* 61: 865-873.