



"Bidang 3 : Pangan, Gizi dan Kesehatan"

**PERTUMBUHAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT LG71 ASAL SEDIMEN
MANGROVE PANTAI LOGENDING PADA KONSENTRASI GLUKOSA DAN
LAMA INKUBASI BERBEDA**

Dyah Fitri Kusharyati, Oedjijono, Taruna Dwi Satwika¹ dan Afifah Mariana

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

ABSTRAK

Isolat LG71 merupakan isolat bakteri asam laktat asal sedimen mangrove Pantai Logending, Kebumen. Isolat tersebut dilaporkan mampu menghasilkan metabolit berupa bakteriosin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen. Namun optimasi pertumbuhan isolat LG71 perlu penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan produksi bakteriosin. Produksi bakteriosin dapat ditingkatkan dengan cara meningkatkan pertumbuhan BAL. Semakin tinggi biomassa sel semakin tinggi pula bakteriosin yang dihasilkan. Peningkatan pertumbuhan BAL dapat dilakukan dengan penambahan glukosa dan memperpanjang waktu inkubasi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi terbaik untuk produksi biomassa sel isolat LG71. Penelitian dilakukan dengan tahapan peremajaan isolat BAL dan uji produksi biomassa sel BAL. Uji produksi biomassa sel dilakukan menggunakan penambahan glukosa 0%, 0,25%, 0,5%, dan 0,75%, sedangkan waktu inkubasi dilakukan selama 15 jam, 18 jam, 21 jam, dan 24 jam. Percobaan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial. Parameter yang diamati antara lain jumlah sel, turbiditas kultur dan kadar asam laktat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian tambahan glukosa dengan berbagai konsentrasi dan lama waktu inkubasi berbeda tidak menunjukkan perbedaan hasil yang nyata terhadap total populasi isolat BAL LG71. Kekeruhan kultur dan kadar asam laktat juga tidak mengalami peningkatan pada jam ke-15 sampai 24. Hal ini diduga karena kultur sudah memasuki fase stasioner pada jam ke-15 sehingga perlu dilakukan pengujian produksi biomassa sel sebelum jam ke-15.

Kata kunci: Bakteriosin, BAL, glukosa, mangrove, optimasi

ABSTRACT

LG71 is an isolate of lactic acid bacteria from mangrove sediments of Logending Beach, Kebumen. The isolate was reported to be able to produce bacteriocins which have antibacterial activity against pathogenic bacteria. However, it is necessary to optimize the growth of LG71 isolate so that it can increase the production of bacteriocin. Bacteriocin production can be increased by increasing the growth of LAB. The higher the cell biomass, the higher the bacteriocin produced. The increase in LAB growth can be done by adding glucose and extending the incubation time. The aim of this study was to determine the best glucose concentration and incubation time for cell biomass production of LG71 isolate. The study was conducted by re-culturing LAB isolates and testing LAB cell biomass production. The cell biomass production test was carried out using the addition of glucose as much as 0%, 0.25%, 0.5%, and 0.75%, while the incubation time was carried out for 15 hours, 18 hours, 21 hours, and 24 hours. The experiment was conducted using a factorial Completely Randomized Design (CRD). Parameters observed were the number of cells, culture turbidity and lactic acid levels. The results showed that the addition of glucose with various concentrations and different incubation times did not significantly affect the total population of LAB isolates LG71. Culture turbidity and lactic acid levels also did not increase at 15 to 24 hours. This was presumably because the culture had entered the stationary phase at 15 hours so it was



necessary to test cell biomass production before 15 hours.

Keywords: Bacteriocin, glucose, LAB, mangroves, optimization

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) telah dikenal sebagai kelompok bakteri yang menguntungkan karena memiliki aktivitas probiotik potensial, berperan utama dalam proses fermentasi makanan, dan dikenal sebagai agen preservasi pada industri makanan. BAL mampu menfermentasi gula menjadi asam laktat yang dikenal sebagai agen biopreservatif dan perisa alami (Adnan dan Tan, 2007). Kemampuan biopreservatif BAL disebabkan oleh aktivitas metabolit yang dihasilkannya. Beberapa isolat BAL dilaporkan sebagai penghasil metabolit berupa bakteriosin dan metabolit anti fungi yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Yang et al., 2012; Gerez et al., 2013; Cheong et al., 2014). Beberapa penelitian melaporkan bahwa bakteriosin mampu menghambat bakteri pembusuk dan patogen tular makanan, seperti *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio* sp. (Stiles 1996; Čanak et al., 2018).

Isolat BAL LG71 merupakan BAL koleksi Laboratorium Mikrobiologi yang diisolasi dari sedimen mangrove Pantai Logending. Isolat ini telah diketahui mampu menghasilkan bakteriosin dan ekstrak kasar bakteriosinnya memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen tular makanan, yaitu *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, dan *Listeria monocytogenes* (Kusharyati et al., 2021). Hal ini menunjukkan potensinya yang tinggi untuk dijadikan kandidat agen biopreservasi produk hasil laut. Namun, isolat LG71 masih perlu diuji lebih lanjut untuk mengoptimalkan pertumbuhan. Hal ini karena pertumbuhan erat kaitannya dengan peningkatan jumlah sel dan produksi bakteriosin.

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan BAL adalah medium pertumbuhan. Formulasi medium pertumbuhan yang tepat dapat meningkatkan pertumbuhan BAL. Glukosa merupakan salah satu sumber karbon yang dapat dimanfaatkan oleh BAL. Penambahan glukosa pada medium pertumbuhan telah dilaporkan dapat meningkatkan pertumbuhan BAL (Subagiyo et al. 2015). Selain itu, waktu inkubasi juga berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba dan produksi akhir biomassa (Leroy dan de Vuyst, 2001). Setiap jenis bakteri memiliki karakter yang berbeda, sehingga terdapat perbedaan pada pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh dan beradaptasi, serta produk akhir yang dihasilkan. Kinetika pertumbuhan bakteri adalah hubungan antara pertumbuhan biomassa yang berkorelasi dengan jumlah substrat yang digunakan serta produk akhir yang dihasilkan (Safitri et al., 2016). Kombinasi antara penambahan glukosa dan waktu inkubasi yang tepat perlu dikaji untuk bisa meningkatkan produksi biomassa sel isolat LG71 sehingga akan berkorelasi positif dengan kuantitas bakteriosin yang dihasilkan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi glukosa dan waktu inkubasi terbaik dalam produksi biomassa sel isolat LG71.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman dari bulan April sampai Agustus 2021. Penelitian terdiri dari 2 tahap yaitu peremajaan isolat dan uji produksi biomassa sel BAL.

Peremajaan isolat dan konfirmasi isolat BAL

Sebanyak satu ose isolat BAL diinokulasikan ke dalam 10 mL medium MRSB. Inkubasi



Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers

"Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan XI"

12-14 Oktober 2021

Purwokerto

ISBN 978-602-1643-67-9

dilakukan selama 48 jam pada suhu 37°C. BAL yang telah aktif kemudian dibuat stok pada medium *de Man, Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA) (Oxoid) dengan cara menggoreskan satu ose pada medium MRSA miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

Uji produksi biomassa sel BAL

Sebanyak 1 mL kultur aktif BAL diinokulasikan kedalam media *de Man, Rogosa and Sharpe Broth* (MRSB) 20 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 2 ml kultur tersebut kemudian diinokulasikan ke dalam 4 jenis medium produksi biomassa sel (volume medium 200 ml), yaitu:

- MRSB+Glukosa 0%
- MRSB+Glukosa 0,25%
- MRSB+Glukosa 0,5%
- MRSB+Glukosa 1%

Masing-masing medium diinkubasi pada suhu 37°C pada shaker orbital dengan kecepatan 120 rpm. Pada jam ke-15, 18, 21, dan 24 dilakukan pengukuran jumlah sel, turbiditas kultur, dan kadar asam laktat. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga akan terbentuk 48 unit percobaan.

Pengukuran jumlah sel

Pengukuran jumlah sel dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Sebanyak 1 ml kultur BAL pada medium produksi biomassa sel dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10⁻⁸. Sebanyak 1 ml suspensi dari tiga tabung pengenceran terakhir diinokulasikan ke dalam medium MRSA secara *pour plate*. Media MRSA diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh dihitung dan jumlah sel dinyatakan dalam satuan *colony forming unit per ml* (CFU's/ml). Rumus perhitungan koloni sebagai berikut:

$$\text{CFU's/ml} = \text{JK} \times 1\text{FP}$$

Keterangan:

CFU's/ml : unit pembentuk koloni dalam 1 ml suspensi sampel

JK : Jumlah koloni

FP : Faktor pengenceran

Pengukuran turbiditas kultur BAL

Pengukuran turbiditas kultur BAL dilakukan dengan metode spektrofotometri. Sebanyak 3 ml kultur cair BAL diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan natan disuspensikan dengan 3 ml buffer fosfat (pH 7). Suspensi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Blanko yang digunakan adalah buffer fosfat (pH 7).

Pengukuran kadar asam laktat

Sampel diambil sebanyak 10 mL dan ditetesi indikator phenolphthalein (PP) 1% sebanyak 3 tetes. Sampel dititrasi hingga berwarna merah muda menggunakan NaOH 0,1 N. Persentase asam laktat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{V1 \times N \times 90}{V2 \times 1000} \times 10$$

Keterangan:

V1 = Volume NaOH yang digunakan (mL)

V2 = sampel yang dititrasi (mL)

N = Normalitas NaOH



Data jumlah sel setiap perlakuan dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA) pada tingkat kesalahan 5% dan 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

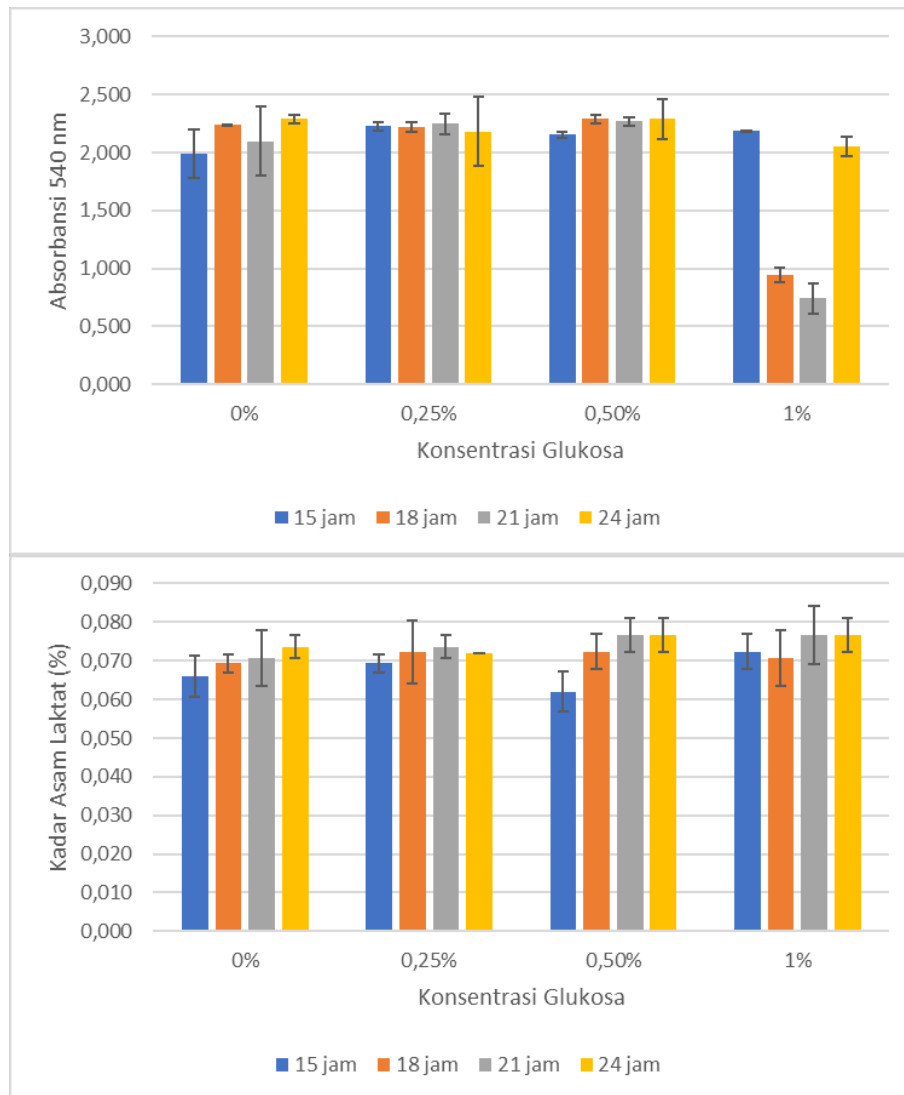
Percobaan produksi biomassa sel menunjukkan bahwa perlakuan penambahan glukosa dan waktu inkubasi berbeda tidak berpengaruh terhadap produksi biomassa sel isolat LG71. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan penambahan glukosa, waktu inkubasi dan interaksi antara kedua perlakuan tidak menunjukkan perbedaan pada biomassa sel BAL LG71. Hal ini ditunjukkan dengan hasil total populasi bakteri yang hampir sama untuk setiap perlakuan (Tabel 1). Pengamatan jam ke-15 sampai 24 tidak menunjukkan adanya kenaikan biomassa sel yang signifikan dan cenderung stagnan. Hasil penelitian ini berbeda dengan laporan penelitian yang lain. Penambahan glukosa 1% memberikan pengaruh meningkatkan produksi sel setelah waktu pertumbuhan 18 jam dan 24 jam (Subagiyo et al. 2015). Glukosa merupakan salah satu sumber karbon yang baik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Glukosa merupakan monosakarida yang bisa langsung dimanfaatkan oleh bakteri asam laktat dalam metabolismenya. Keberadaan glukosa pada medium pertumbuhan juga dilaporkan sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri asam laktat. Penambahan glukosa 5% dan ammonium sulfat 1% pada substrat whey tahu meningkatkan laju pertumbuhan bakteri asam laktat *Pediococcus pentosaceus* (Safitri et al. 2016).

Tabel 1. Jumlah Sel LG71 pada Perlakuan Konsentrasi Glukosa dan Waktu Inkubasi Berbeda

Konsentrasi Glukosa	Waktu Inkubasi			
	15 jam	18 jam	21 jam	24 jam
0%	7,85±0,18 (a)	7,53±0,92 (a)	7,43±1,10 (a)	8,58±0,81 (a)
0,25%	8,19±0,03 (a)	7,70±0,91 (a)	7,61±1,21 (a)	7,57±0,86 (a)
0,5%	7,93±0,17 (a)	8,00±0,61 (a)	8,02±1,55 (a)	8,07±1,38 (a)
075%	7,63±1,08 (a)	6,95±0,54 (a)	7,52±0,80 (a)	8,29±0,25 (a)

Keterangan: Huruf di dalam tanda kurung menunjukkan notasi hasil analisis sidik ragam pada taraf kepercayaan 5% dan 1%. Huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan hasil antar perlakuan.

Hasil pengukuran kekeruhan kultur pada konsentrasi glukosa 0%; 0,25%; dan 0,5% tidak menunjukkan peningkatan pada jam ke-15 sampai 24 (Gambar 1a). Hasil berbeda ditunjukkan oleh perlakuan glukosa 0,75%, yaitu absorbansi pada jam ke-18 dan 21 menurun dan kembali naik pada jam ke-24. Kadar asam laktat dan kekeruhan kultur juga tidak ada kenaikan yang signifikan pada jam ke-15 sampai 24 (Gambar 1b). Peneliti lain melaporkan hasil yang berbeda. Peningkatan kadar glukosa di awal fermentasi *batch* mengakibatkan peningkatan konsentrasi asam laktat di akhir fermentasi (Hujanen et al. 2001).



Gambar 1. Pengaruh Perlakuan Konsentrasi Glukosa dan Waktu Inkubasi Berbeda terhadap Kekeruhan Kultur LG71 dan Kadar Asam Laktat. (a) Kekeruhan Kultur LG71 (b) Kadar Asam Laktat

Tidak adanya peningkatan biomassa sel isolat LG71 pada jam ke-15 sampai 24 diduga karena kultur telah melewati fase logaritmik dan sudah mencapai fase stasioner. Dugaan ini berlandaskan pada tidak terjadi peningkatan jumlah populasi isolat yang signifikan pada setiap interval 3 jam perlakuan dari jam ke-15 sampai 24. Begitu pula dengan kadar asam laktat dan kekeruhan kultur. Biomassa sel mencapai tingkat maksimal saat memasuki fase stasioner yang ditandai dengan jumlah sel yang cenderung stabil dan peningkatan jumlah sel berhenti (Safitri et al. 2016). Pengujian pengaruh konsentrasi glukosa terhadap biomassa sel isolat LG71 akan lebih baik bila dilakukan sebelum jam ke-15 untuk mengetahui peningkatan kecepatan pertumbuhan pada fase logaritmik.

KESIMPULAN

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pemberian glukosa 0%; 0,25%; 0,5% dan 0,75% tidak berpengaruh terhadap peningkatan biomassa sel bakteri LG71 pada waktu inkubasi 15 jam, 18 jam,



21 jam, dan 24 jam. Hal ini diduga karena kultur LG71 sudah mencapai fase stasioner pada jam ke-15 sampai dengan jam ke-24.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unsoed yang telah memberikan dana penelitian dengan sumber DIPA UNSOED Tahun Anggaran 2021 melalui skema penelitian Riset Dasar Unsoed.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, A. F. M., I. K. P. Tan. 2007. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of The Isolates for Industrial Potential. *Bioresource Technology* 98: 1380–1385. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.034.
- Čanak, I., K. Markov, E. Melvan, A. Starčević, M. Živković, M. Zdravec, J. Pleadin, Ž. Jakopović, D. Kostelac, J. Frece. 2018. Isolation and Characterisation of *L. plantarum* O1 Producer of Plantaricin as Potential Starter Culture for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food Technol. Biotechnol* 56 (4): 581-589. doi: 10.17113/ftb.56.04.18.5707.
- Cheong, E. Y. L., A. Sandhu, J. Jayabalan, T. T. K. Le, N. T. Nhiep, H. T. M. Ho, J. Zwielehner, N. Bansal, M. S. Turner. 2014. Isolation of Lactic Acid Bacteria with Antifungal Activity Against the Common Cheese Spoilage Mould *Penicillium Commune* and Their Potential as Biopreservatives in Cheese. *Food Control* 46: 91-97. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.011.
- Gerez, C. L., M. J. Torres, G. Font de Valdez, G. Rollán. 2013. Control of Spoilage Fungi by Lactic Acid Bacteria. *Biological Control* 64: 231–237. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.10.009.
- Hujanen, M., S. Linko. Y.-Y. Linko, M. Leisola. 2001. Optimisation of Media and Cultivation Conditions for L(+)(S)-Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 126–130. doi: 10.1007/s002530000501.
- Kusharyati, D. F., T. D. Satwika, A. Mariana, A. Rovik. 2021. Potential Screening of Bacteriocinogenic-Lactic Acid Bacteria from Mangrove Sediment of Logending Beach for Fisheries Product Preservation. *J. Tropical Biodiversity Biotechnology* 06: jtbb61927. doi: 10.22146/jtbb.61927.
- Leroy, F., L. de Vuyst, 2001. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain Ctc 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: A nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4407-4413.
- Safitri, N., T. C. Sunarti, A. Meryandini. 2016. Formula Medium Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *Pediococcus Pentosaceus* Menggunakan Substrat Whey Tahu. *Jurnal Sumberdaya Hayati* 2(2): 31-38.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331–45. doi: 10.1007/BF00395940.
- Subagiyo, S., S. Margino, T. Triyanto. 2015. Pengaruh penambahan berbagai jenis sumber karbon, nitrogen dan fosfor pada medium deMan Rogosa And Sharpe (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis* 18(3): 127-132.
- Yang, E., L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette, S. Fillmore. 2012. Antimicrobial Activity Of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheeses and Yogurts. *AMB Express* 2:48.