

## PEMBENTUKAN ASAM ORGANIK OLEH ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PADA MEDIA EKSTRAK DAGING BUAH DURIAN (*Durio zibethinus* Murr.)

Hasrul Satria Nur

Program Studi Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat  
Jl. Jend. A Yani Km 35.8 Banjarbaru Kalimantan Selatan

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pola dan kemampuan dua isolat bakteri asam laktat, *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus fersantum* dalam membentuk asam organik menggunakan media buah durian. Hipotesis yang diajukan adalah (1) kedua isolat mampu membentuk beberapa jenis asam organik, dan (2) pembentukan asam organik oleh kedua isolat menunjukkan pola tertentu.

Sebagai media fermentasi digunakan media ekstrak daging buah durian yang diinokulasikan dengan 2 jenis isolat bakteri asam laktat, kemudian diinkubasi selama 0, 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 hari fermentasi. Kadar dan jenis asam yang terbentuk selama fermentasi diukur dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Data yang diperoleh dianalisis ragam dan uji lanjut polinomial ortogonal pada taraf 5%. Pola pembentukan asam organik didekati dengan analisis regresi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *L. casei* mampu membentuk asam laktat, asam asetat, asam butirat, dan asam propionat, sedangkan isolat *L. fersantum* hanya membentuk asam laktat dan asam asetat. Pembentukan asam laktat oleh *L. casei* mengikuti pola kuadratik dengan persamaan  $Y = -0,0103 + 0,1315X - 0,0099X^2$ , menunjukkan bahwa jumlah asam laktat meningkat pada hari tertentu dan kemudian menurun. Hubungan kuadratik juga ditunjukkan pada asam butirat ( $Y = 0,0103 - 0,0025X - 0,0001X^2$ ), sedangkan pola pembentukan asam propionat mengikuti pola linear ( $Y = 0,0211 + 0,0025X$ ). Pembentukan asam laktat oleh *L. fersantum* mengikuti pola kuadratik dengan persamaan  $Y = 0,4145 + 0,0863X - 0,0096X^2$ . Kedua isolat juga menunjukkan perbedaan pada pola pembentukan asam asetat. Perbedaan jenis dan kadar asam organik yang terbentuk diduga berhubungan dengan perbedaan jalur fermentasi dari kedua isolat bakteri asam laktat.

Kata kunci : asam organik, isolat B1 dan B2, fermentasi, ekstrak buah durian, HPLC

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat mempunyai peranan esensial hampir dalam semua proses fermentasi makanan dan minuman. Peran utama bakteri ini dalam industri makanan adalah untuk pengasam bahan mentah dengan memproduksi sebagian besar asam laktat (bakteri homofermentatif) atau asam laktat, asam asetat, etanol dan CO<sub>2</sub> (bakteri heterofermentatif) (Desmazeaud, 1996). Bakteri asam laktat banyak digunakan dalam produk susu seperti yogurt, *sour cream* (susu asam), keju, mentega, dan produksi asam-asaman, serta asinan (Lindquist, 1998).

Asam-asam organik dari produk fermentasi merupakan hasil hidrolisis asam lemak dan juga sebagai hasil aktivitas pertumbuhan bakteri. Penentuan kuantitatif asam organik pada produk fermentasi adalah penting untuk mempelajari kontribusi bagi aroma sebagian besar produk fermentasi, alasan gizi, dan sebagai indikator aktivitas bakteri (Bevilacqua & Califano, 1989). Asam-asam organik juga sering digunakan sebagai *acidulants* (bahan pengasam) yang dapat menurunkan pH. Sehingga pertumbuhan mikroba berbahaya pada produk fermentasi akan terhambat (Winarno, 1997).

Menurut Rahayu dkk. (1995) pada fermentasi tempoyak ditemukan bakteri asam laktat yang diduga adalah *Lactobacillus casei* sub sp. *rahamnosus* yang bersifat fakultatif heterofermentatif dan *Lactobacillus fersantum* yang bersifat heterofermentatif.

Pada fermentasi tempoyak dalam penelitian Ekowati (1998) terbentuk asam-asam organik meliputi asam butirat 7,3% untuk substrat daging buah kuning dan 6,2% untuk substrat daging buah putih, asam laktat 1,6% (daging buah putih) dan 1,7% (daging buah kuning). Kadar asam asetat 0,34% untuk daging buah putih dan 0,27% untuk daging buah kuning, serta kadar asam malat dan sitrat kurang dari 0,01%. Sejauh ini belum ada informasi tentang kemampuan pembentukan asam organik baik jumlah dan jenisnya oleh masing-masing isolat bakteri asam laktat

*Lactobacillus casei* (B1) dan *Lactobacillus fersantum* (B2) dari tempoyak pada media daging buah durian.

## **BAHAN DAN METODE**

Dalam penelitian digunakan media ekstrak buah durian, media MRS agar (Oxoid), larutan standar asam organik (asam laktat, asam butirat, asam asetat, dan asam propionat), larutan 0,5% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -0,4% (v/v) buffer acetonitril (pada pH 2,24 dengan  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), asam oksalat, NaOH 0,1 N, indikator phenolphthalein 1%, akuades netral, alkohol 70%, kapas, aluminium foil, kertas saring, dan isolat bakteri asam laktat B<sub>1</sub> dan B<sub>2</sub> hasil isolasi dari tempoyak yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung.

Penelitian disusun secara faktorial dua faktor dalam rancangan acak kelompok (RAK). Faktor pertama yang diuji adalah isolat bakteri asam laktat *Lactobacillus casei* (B1) dan *Lactobacillus fersantum* (B2) dan faktor kedua adalah lama waktu fermentasi (0, 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 hari fermentasi). Variabel yang diamati adalah kadar asam organik dan perubahan pH substrat yang dihasilkan. Data yang diperoleh dianalisis ragam kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut polinomial ortogonal dan uji regresi. Semua analisis data dilakukan dengan program SAS pada taraf nyata 5% (Steel & Torrie, 1993).

### **Pembuatan media ekstrak daging buah durian**

Daging buah durian yang matang ditambahi akuades steril dengan perbandingan 1: 5 (w/v), kemudian diblender dan dipanaskan dalam waterbath selama 20 menit pada suhu 80° C, dan selanjutnya disaring untuk mendapatkan ekstrak buah durian. pH ekstrak diatur hingga pH 6 (Rahayu dkk., 1995) dengan menambahkan larutan HCl atau NaOH 0,1 N. Ekstrak disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit (Lay, 1994).

### **Perbanyak isolat dan pembuatan suspensi bakteri asam laktat**

Masing-masing koloni isolat bakteri asam laktat jenis B1 dan B2 yang diisolasi dari tempoyak dibiakkan pada media De Man, Rogosa, and Sharpe Agar (MRSA) miring dengan cara goresan. Isolat bakteri yang berumur 48 jam kemudian disuspensikan dengan akuades steril. Selanjutnya dilakukan penggojokan dengan *vortex mixer* selama 1-2 menit. Kepadatan sel suspensi bakteri dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* (Joetono dkk., 1980).

### **Fermentasi bakteri asam laktat**

Suspensi bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam 25 ml media ekstrak daging buah durian dengan kepadatan  $10^6$  sel/ml sebanyak 42 buah labu erlenmeyer. Kemudian diinkubasi dan diamati pada hari ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, dan 12.

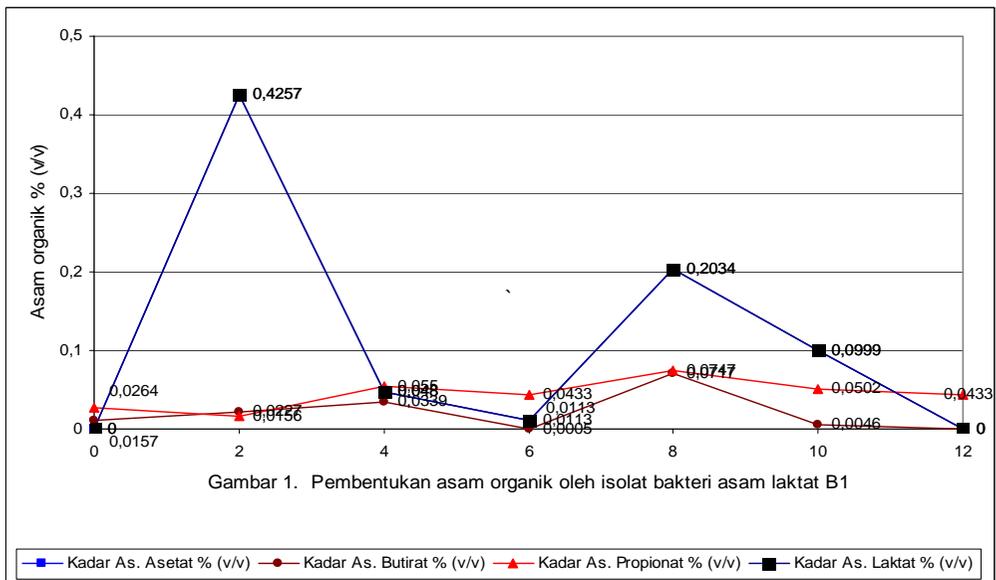
### **Pengukuran kadar dan jenis asam organik**

Kadar dan jenis asam organik diukur menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode preparasi sampel adalah seperti yang digambarkan oleh Ekowati (1998) dengan sedikit modifikasi. Pada metode ini, sebanyak 0.7 gram sampel ditambah 5 ml buffer acetonitril, dihomogenisasi, diekstraksi selama 1 jam dan disentrifugasi pada 7000 rpm selama 5 menit. Supernatan disaring menggunakan kertas saring 0,45 mikrometer dan diulang dua kali. Elusi yang digunakan adalah elusi isokratik dengan eluen (fase gerak) air bidistilasi 100%, laju alir (*flow rate*) 1,5 ml/menit. Detektor yang digunakan adalah UV-Vis Shimadzu SPD-6AV dengan panjang gelombang 214 nanometer, sedangkan kolom yang digunakan adalah LC-C8 Shin-Pack (0,15 m x 6,0 mm). pH sampel diukur dengan pH meter (Orion model 420 A).

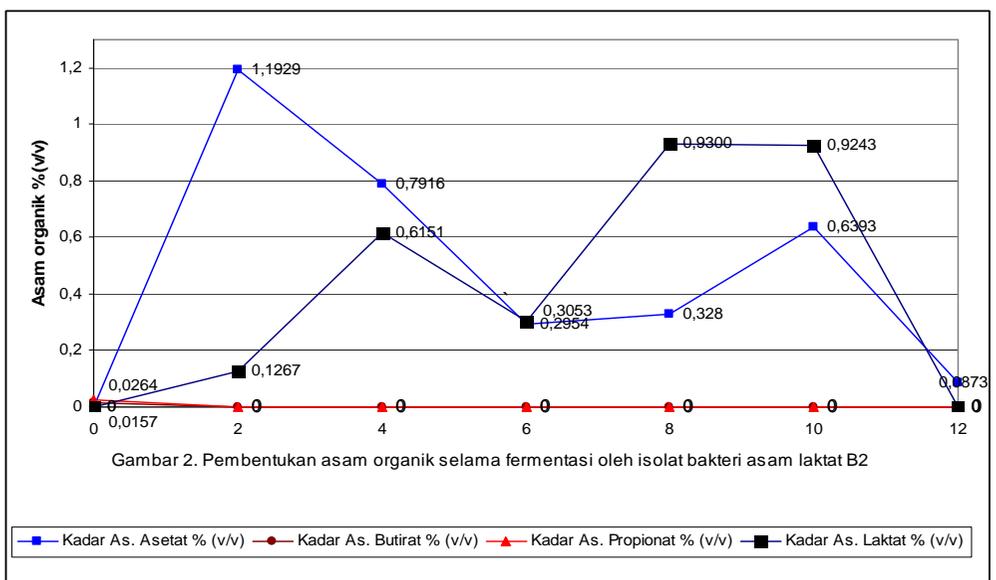
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar dan Jenis Asam Organik

Kadar dan jenis asam organik oleh isolat bakteri asam laktat B1 dan B2 dalam membentuk asam organik pada media ekstrak daging buah durian disajikan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Pembentukan asam organik oleh isolat bakteri asam laktat B1



Gambar 2. Pembentukan asam organik selama fermentasi oleh isolat bakteri asam laktat B2

Hasil analisis ragam data asam laktat dan uji polinomial ortogonal menunjukkan bahwa hubungan antara jenis isolat bakteri asam laktat dan lama fermentasi berbeda nyata, sedangkan interaksi keduanya tidak berbeda nyata.

Berdasarkan persamaan regresi  $Y = -0,0103 + 0,1315X - 0,0099X^2$ ;  $R^2 = 0,485$  menunjukkan bahwa lama fermentasi terhadap produksi asam laktat meningkat pada hari tertentu yaitu 0,422% (v/v) pada hari ke-6 yang kemudian menurun hingga 0,141% (v/v) pada hari ke-12 fermentasi.

Peningkatan produksi asam laktat sebesar 0,422% (v/v) pada hari ke-6 fermentasi menunjukkan bahwa aktivitas kedua isolat bakteri asam laktat mencapai fase pertumbuhan logaritmik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kartika (2000) bahwa fase logaritmik isolat bakteri asam laktat B1 mulai pada hari ke-0 sampai hari ke-7, sedangkan isolat B2 mulai pada hari ke-0 sampai hari ke-5. Menurut Buckle (1987) pada fase logaritmik sel-sel bakteri akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai jumlah maksimum dan dapat dibantu oleh faktor lingkungan seperti pH, media tumbuh, nutrisi, temperatur, dan kelembapan udara.

Analisis ragam data asam asetat menunjukkan hubungan antara isolat bakteri, lama fermentasi, dan interaksi keduanya menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Hasil uji lanjut polinomial ortogonal produksi asam asetat oleh isolat bakteri asam laktat B1 dan B2 menunjukkan perbedaan pola di antara kedua isolat bakteri. Isolat B2 menunjukkan pola kuadratik dengan persamaan regresi B2:  $Y = 0,4145 + 0,0863X - 0,0096X^2$ ;  $R^2 = 0,657$ , dan mencapai puncaknya pada hari ke-4 sebesar 0,606 % (v/v). Sementara itu, produksi asam asetat oleh isolat B1 tidak nyata.

Adanya perbedaan pola pembentukan asam asetat antara kedua isolat tersebut sesuai dengan hasil penelitian Ekowati (1998) yang menyatakan bahwa kedua isolat bakteri asam laktat mempunyai perbedaan secara fisiologis, yaitu isolat B1 bersifat heterofermentatif, sedangkan isolat B2 bersifat fakultatif heterofermentatif. Perbedaan sifat fisiologis ini menyebabkan jalur fermentasi antara kedua isolat bakteri berbeda. Produksi asam asetat oleh isolat B2 lebih tinggi

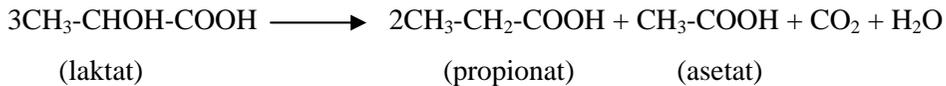
dari isolat B1. Hal ini disebabkan karena isolat B2 mempunyai enzim-enzim yang lebih baik untuk produksi asam asetat. Seperti yang dikemukakan oleh Stamer (dalam Rahayu, 1995) bakteri asam laktat heterofermentatif seperti isolat B2 mampu menghasilkan enzim glukosa-6-fosfat dehidrogenase dan enzim 6-fosfoglukonat dehidrogenase, sedangkan bakteri asam laktat fakultatif heterofermentatif (isolat B1) menghasilkan enzim-enzim fruktosa difosfat aldolase selain kedua enzim yang terdapat pada heterofermentatif.

Dari pengukuran kadar asam butirat yang dapat dideteksi oleh *HPLC* terlihat bahwa isolat B1 mampu membentuk asam butirat mencapai 0,0717 % (v/v). Hal ini menunjukkan bahwa isolat B1 tidak hanya menggunakan karbohidrat sebagai bahan dasar untuk membentuk asam butirat, tetapi juga mampu menggunakan lemak. Kemampuan isolat B1 dalam menggunakan lemak sebagai substrat berhubungan dengan aktivitas enzim lipase (Handayani, 2000). Hasil analisis ragam data asam butirat dan uji lanjut polinomial ortogonal menunjukkan bahwa hubungan antara jenis isolat bakteri asam laktat dan interaksi keduanya tidak nyata. Waktu fermentasi menunjukkan beda nyata dengan membentuk garis lengkung (kuadrat) dengan persamaan regresi  $Y = 0,0103 - 0,0025X - 0,0001X^2$ ;  $R^2 = 0,665$ . Hal ini berarti bahwa dengan semakin lama waktu fermentasi kadar asam butirat akan meningkat dan menurun pada hari tertentu.

Hasil analisis ragam data asam propionat menunjukkan bahwa hubungan antara jenis isolat bakteri asam laktat, lama fermentasi, dan interaksi keduanya berbeda nyata. Berdasarkan perbandingan ortogonal isolat bakteri asam laktat B1 menunjukkan suatu pola linier terhadap kadar asam propionat yang terbentuk selama fermentasi, dengan persamaan regresi  $Y = 0,0211 + 0,00245X$  dengan  $R^2 = 0,560$ . Hal ini berarti produksi asam propionat oleh isolat B1 selama 12 hari fermentasi mengalami peningkatan.

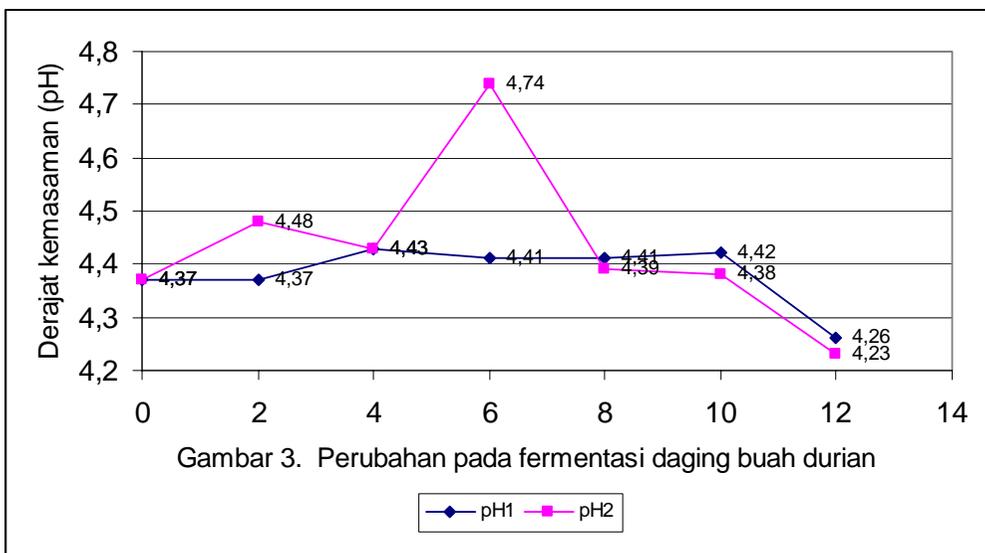
Peningkatan kadar asam propionat oleh isolat B1 selama waktu fermentasi diduga akibat degradasi asam laktat menjadi asam propionat. Hal ini terlihat dari penurunan kadar asam laktat selama waktu fermentasi. Menurut Schlegel (1994);

Brock & Madigan (1991) bahwa asam laktat yang terbentuk pada proses fermentasi sebagian besar diubah menjadi asam propionat. Reduksi asam laktat menjadi asam propionat terjadi melalui alur metil malonil- KoA. Pembentukan asam propionat dari asam laktat berlangsung menurut persamaan reaksi sebagai berikut :



### Perubahan pH

Perubahan pH pada fermentasi daging buah durian disajikan pada Gambar 3. Nilai pH substrat pada awal fermentasi adalah 4,37 untuk kedua isolat. Selama waktu fermentasi pH substrat bakteri asam laktat menurun hingga 4,26 untuk isolat B1 dan 4,23 untuk isolat B2 pada hari ke 12. Hasil analisis ragam data pH dan uji lanjut polinomial ortogonal menunjukkan bahwa hubungan antara jenis isolat bakteri dan interaksi kedua isolat terhadap waktu fermentasi tidak berbeda nyata.



Perubahan pH disebabkan karena terbentuknya asam - asam organik oleh kedua isolat bakteri asam laktat dalam substrat buah durian. Nilai pH pada kedua isolat bakteri asam laktat tersebut masih merupakan pH optimum bagi aktivitas bakteri asam laktat . Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Djaafar, dkk.,1996) bahwa derajat keasaman (pH) yang optimum bagi aktivitas bakteri asam laktat berkisar antara pH 3 – 8.

## KESIMPULAN

1. Isolat B1 pada media ekstrak buah durian mampu membentuk asam laktat, asam asetat, asam butirat, dan asam propionat, sedangkan isolat B2 hanya mampu membentuk asam laktat dan asetat.
2. Pembentukan asam laktat oleh isolat B1 mengikuti pola kuadrat dengan persamaan  $Y = -0,0103 + 0,1315X - 0,0099X^2$ . Hubungan kuadrat juga ditunjukkan pada asam butirat ( $Y = 0,0103 - 0,0025X - 0,0001X^2$ ), sedangkan pola pembentukan asam propionat mengikuti pola linear ( $Y = 0,0211 + 0,0025X$ ). Pembentukan asam laktat oleh isolat B2 mengikuti pola kuadrat dengan persamaan  $Y = 0,4145 + 0,0863X - 0,0096X^2$ . Kedua isolat asam laktat juga menunjukkan perbedaan pada pola pembentukkan asam asetat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bevilacqua, AE & AN Califano. 1989. Determination of Organic Acid in Dairy Product by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Sci.* 56 (4), 1076-1077.
- Brock, TD & MT Madigan. 1991. *Biology of Microorganism*. Sixth edition. "Prentice Hall" Englewood Cliffs, New Jersey
- Buckle, KA, RA Edwards, GH Fleet dan M. Wootton. 1987. *Ilmu Pangan*. UI-Press, Jakarta.
- Djaafar, TF, ES Rahayu, D Wibowo dan S Sudarmadji. 1996. Substansi Antimikrobia Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Makanan Hasil Fermentasi Tradisional Indonesia. *J.Pert Indo* 6 (1), 15-21
- Desmazeaud, M. 1996. Lactic Acid Bacteria in Food: Use and Safety. *Cahiers Agricultures*. 5 (5), 331-342.

- Ekowati, ChN. 1998. Suksesi Mikroba dan Pembentukan Asam Organik pada Fermentasi Buah Durian (*Durio Zibethinus* Murr.). Thesis Program Pasca Sarjana. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Handayani, M. 2000. Uji Aktivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Ekstrak Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). Skripsi FMIPA. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Joetono, J, S Hartadi, S Kabirun, Suhadi, dan Susanto. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian. UGM, Yogyakarta.
- Kartika, WS. 2000. Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). Skripsi FMIPA. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Lindquist, J. 1998. General Overview of The Lactic Acid Bacteria. Departement of Bacteriology, University of Wisconsin. Madison. *Food Science* (324), 102.
- Lay, BW. 1994. *Analisis Mikrobial di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Rahayu, ES., Sudarmadji, D Wibowo, dan TF. Djaafar. 1995. Isolasi Bakteri Asam Laktat dan Karakteristik Agensia yang Berpotensi Sebagai *Biosafety* Makanan Indonesia. *Laporan Penelitian* PAU Pangan dan Gizi. UGM, Yogyakarta.
- Schlegel, HG. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Keenam. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Steel, RGD & JH Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. Edisi Kedua. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winarno, FG. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.