

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI AWAL BAKTERI ASAM LAKTAT HALOFIL PROTEOLITIK SELAMA FERMENTASI SAUS IKAN LELE (*CLARIAS SP*)

Isolation and Early Identification of Halophilic Lactic Acid Bacteria Produce Proteolytic Enzyme during Catfish Sauce (*Clarias sp*)

Niko Listiyo, Nanik Suhartatik, Kapti Rahayu Kuswanto

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan isolat Bakteri. Asam Laktat (BAL) halofil yang mampu menghasilkan enzim proteolitik. Isolat yang diperoleh diidentifikasi awal untuk menentukan genus bakteri, sehingga didapatkan isolat yang potensial untuk dikembangkan sebagai kultur starter pada pembuatan kecap ikan lele.

Dalam penelitian ini, kecap ikan lele dibuat dengan kadar garam 10% dan difermentasi selama 3, 5, dan 7 hari, dilakukan analisis total populasi BAL dengan cara ditumbuhkan pada medium deMann Rogosa Sharpe (MRS) yang telah ditambahkan CaCO_3 1%, NaCl 7% dan Na Azida. Pengujian isolat BAL penghasil enzim proteolitik, dilakukan dengan cara menumbuhkan pada medium yang ditambahkan kasein 2%. Bakteri asam laktat yang tumbuh pada medium dengan kadar garam 7%, selanjutnya dilakukan skrining sifat penghasil enzim proteolitik, dengan menumbuhkan pada medium yang ditambahkan kasein 2%. Isolat yang diperoleh, dikarakterisasi menggunakan metode standar antara lain: uji morfologi sel, pengecatan Gram, uji katalase, uji produksi gas, uji pertumbuhan pada suhu, dan pH.

Isolasi bakteri selama fermentasi kecap ikan lele, diperoleh isolat sebanyak 71 isolat bakteri penghasil asam. Namun berdasarkan uji konfirmasi hanya diperoleh 6 isolat BAL, dari 6 isolat tersebut dipilih 2 isolat BAL. Dengan melihat sifat-sifat karakteristik fenotip yang muncul, berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, isolat diidentifikasi sebagai genus *Pediococcus sp*.

Kata kunci: BAL halofil proteolitik, isolasi, identifikasi, kecap ikan lele

ABSTRACT

This research was aimed to getting halophilic Lactic Acid Bacteria (LAB) isolate(s) that produce protease enzyme in the process of catfish sauce, and to identify the genus of the bacteria. Halophilic LAB could be potent to be develop as a starter culture in fish sauce making.

Catfish sauce was made by adding 10% brine in to 100 g of catfish. In the days of 3, 5, dan 7d, samples were took and analyzed for the acid producer bacteria. The colony counting was done using deMann Rogosa Sharp (MRS) medium with the addition of 1% of CaCO_3 , 7% of NaCl, and Na Azida. For proteolytic enzyme, the medium was added by 2% of casein. Lactic acid bacteria was grown on medium with 7 % salt and screening proteolytic isolates with casein 2 %, the isolate(s) were isolated and characterized by using a standard method, among others are: cell morphologic, Gram staining, catalase test, gases production, growth on different temperature, and pH value.

*From the plating procedur, 71 isolates were took and consider as acid producer bacteria. But only 6 isolates were consider as lactic acid bacteria. The six isolates were tested for the proteolytic enzyme and only 2 isolates were protease producers. According to the Bergey's manual of Bacteria Identifictation, the to isolates were identify as *Pediococcus sp*.*

Keywords: Halophilic LAB, isolation, identification, catfish sauce

PENDAHULUAN

Saus berarti cairan yang digunakan sewaktu memasak atau dihidangkan bersama-sama makanan sebagai penyedap atau agar makanan kelihatan menarik. Sambal dan kecap merupakan saus utama pada sebagian besar masakan Indonesia. Saus ikan dibuat dari hasil fermentasi ikan-ikan kecil (teri), ikan hering, sarden, dan sisa limbah pengolahan ikan. Waktu yang dibutuhkan untuk fermentasi kecap ikan relatif lama. Hal ini dianggap merugikan karena juga akan menghabiskan banyak biaya (Afrianto dan Liviawaty, 1996). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mempercepat waktu fermentasi adalah menggunakan enzim untuk mempercepat proses fermentasi (Subroto *et al.*, 1985 dalam Hasnan, 1991). Kandungan garam yang tinggi mencegah pertumbuhan bakteri patogen yang menyebabkan pembusukan (Eyo, 2001).

Fermentasi ikan yang membutuhkan waktu lama bisa dipercepat dengan menggunakan enzim, seperti bromelin, papain, dan beberapa enzim lain (Orejana, 1982 dalam Hasnan, 1991). Proses fermentasi yang terjadi pada ikan merupakan proses penguraian secara biologis atau semibiologis terhadap senyawa-senyawa kompleks terutama protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dalam keadaan terkontrol. Selama proses fermentasi, protein ikan akan terhidrolisis menjadi asam-asam amino dan peptida, kemudian asam-asam amino akan terurai lebih lanjut menjadi komponen-komponen lain yang berperan dalam pembentukan cita rasa.

Menurut Buckle *et al.*, (1987), pada proses fermentasi ikan dengan menggunakan kadar garam tinggi, diperkirakan jenis BAL yang mampu tumbuh dan berkembang adalah dari genus *Lactobacillus* sp, *Pediococcus* sp, dan *Leuconostoc* sp. Bakteri asam laktat mempunyai sistem proteolitik yang kompleks, baik untuk pertumbuhan BAL itu sendiri dan juga memberi kontribusi yang nyata untuk pembentukan flavour pada produk fermentasi. Sehingga diduga adanya peran dari BAL yang bersifat proteolitik pada proses fermentasi ikan. Oktaviani (2015) baru-baru ini telah melakukan penelitian tentang proses pembuatan saus

ikan lele. Hasil penelitian menunjukkan bahwa saus ikan lele dapat dibuat pada kadar garam 7%. Adanya garam pada fermentasi saus ikan lele dapat melibatkan peran bakteri asam laktat halofil. Diduga terjadi perubahan komponen akibat aktivitas BAL halofilik yang bersifat proteolitik. Tujuan penelitian mendapatkan isolat dan identifikasi awal BAL halofil yang menghasilkan enzim protease pada proses pembuatan saus ikan lele. Hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan untuk perbaikan proses fermentasi, agar terkendali/stabil serta dapat diproduksi secara komersial.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

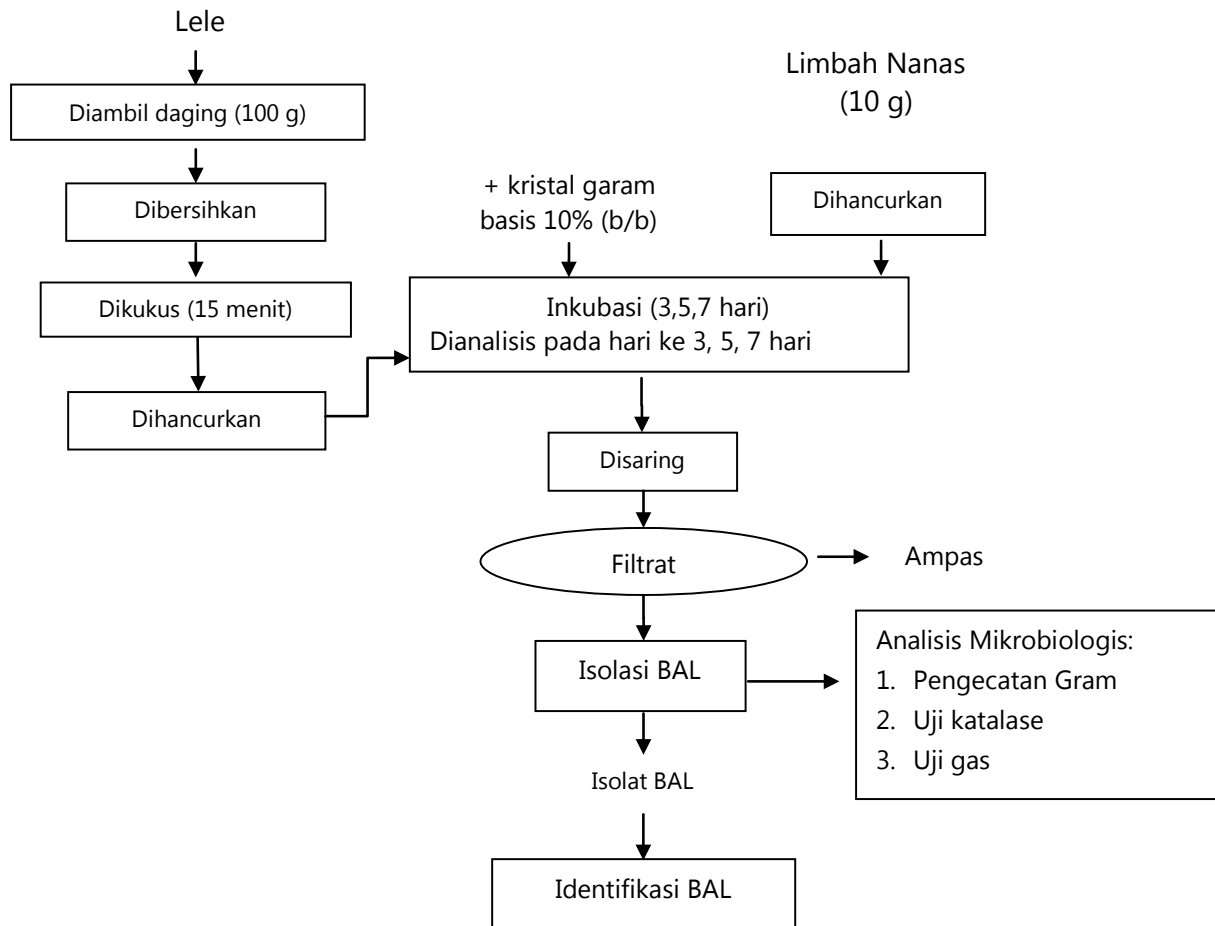
Daging lele, limbah nanas, aquadest, garam dapur, NaCl, *deMann Rogosa Sharp* Agar (MRSA), indikator phenol red, kasein, alkohol 70%, larutan kristal violet, larutan lugol, aseton alkohol, safranin, minyak imersi, kristal CaCO₃, larutan NaCl 0,85%, larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂), larutan buffer pH 4,2, dan pH 8,5.

Alat

Stoples plastik (fermentor), pisau, telenan, panci, sendok, termometer, saringan, botol, timbangan, gelas ukur, dandang, kompor, dan baskom. Timbangan analitik, erlenmeyer, gelas ukur, *laminar air flow cabinet*, inkubator, refrigerator, kulkas, tabung reaksi, botol pengencer, cawan petri, kawat ose, kaca objek, cover glass, mikroskop cahaya, pipetman, tips biru-kuning, vortex, kertas tissue, tabung Durham, bunsen, gelas ukur, beaker glass, buret, pipet ukur, labu takar 100 ml, kertas saring, penangas air, dan *centrifuge*.

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi awal. Proses pembuatan kecap ikan lele berdasarkan dari penelitian sebelumnya yaitu Pemanfaatan Limbah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) pada Pembuatan Kecap Ikan Lele (*Clarias* sp) (Oktaviani, 2015). Proses pembuatan kecap ikan lele dan pengambilan sampel ditunjukkan dalam Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Proses Penelitian

METODE

Konfirmasi isolat bakteri asam laktat meliputi pengamatan morfologis, pengecatan Gram, uji katalase, uji produksi gas, uji aktivitas proteolitik, dan uji tipe halofilik/halotoleran.

Prosedur Analisis

1. Isolasi dan Pemurnian Isolat.

Isolasi bakteri asam laktat menggunakan metode pour plate, dimana 1 ml kecap ikan lele hasil fermentasi dimasukkan ke dalam 9 ml larutan 0.85% garam fisiologis steril dan digojog. Kemudian dilakukan seria pengenceran sampai dengan 10^{-6} dan ditumbuhkan pada media MRS agar yang sudah ditambahkan larutan CaCO_3 1% dan 7% NaCl. Diinkubasikan mikroaerofil, dengan cara *pour plate* dengan penambahan Na Azida dan inkubasi terbalik pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat yang membentuk zona jernih pada media MRS agar dan memiliki kenampakan berbeda diisolasi dan dilakukan pemurnian dengan metode goresan (*streak*

for single colony) pada media yang sama. Perlakuan ini diulang minimal 3 kali sehingga akan diperoleh isolat murni.

2. Uji Aktivitas Proteolitik

Untuk uji proteolitik secara kualitatif, isolat ditumbuhkan lagi pada media MRS agar + 1% CaCO_3 , 7 % NaCl, dan 2% kasein. Serta media MRS agar + 1% CaCO_3 , 7 % NaCl, dan tanpa protein (kasein). Diamati zona jernih yang terbentuk.

3. Uji penentuan tipe halofilik/halotoleran

Uji pengujian ini adalah untuk menentukan bakteri termasuk dalam tipe bakteri bersifat halofilik atau halotoleran. Isolat ditumbuhkan pada media MRS agar + 1% CaCO_3 , 7 % NaCl dan media MRS agar + 1% CaCO_3 tanpa NaCl. Kemudian diinkubasikan mikroaerofil pada inkubator bersuhu 37°C selama 24-48 jam.

4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi BAL dilakukan terhadap isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi dari kecap ikan lele, dikarakterisasi menggunakan

metode standar antara lain: uji morfologi sel, pengecatan Gram, uji katalase, uji produksi gas, uji pertumbuhan pada suhu, dan pH.

Hasil dan Pembahasan

1. Karakteristik Mikrobiologis Kecap Ikan Lele

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap total BAL dan total khamir. Karakteristik mikrobiologis kecap ikan lele dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Mikrobiologis Kecap Ikan Lele selama Fermentasi

Lama Fermentasi (hari)	Total Bakteri Penghasil Asam cfu/ml	Total Yeast
3	$2,53 \times 10^6$	Ttd
5	$4,33 \times 10^7$	Ttd
7	$1,10 \times 10^8$	Ttd

Ket : Ttd = tidak terdeteksi

Selama fermentasi kecap ikan lele, pada fermentasi hari ke-3 jumlah total bakteri pembentuk asam sebanyak $2,53 \times 10^6$ cfu/ml kemudian pada fermentasi hari ke-5 jumlahnya meningkat menjadi $4,33 \times 10^7$ cfu/ml. Sampai dengan fermentasi hari ke-7 masih meningkat dengan jumlah populasi sebanyak $1,10 \times 10^8$ cfu/ml. Peningkatan jumlah populasi bakteri selama fermentasi menunjukkan bahwa bakteri masih dalam keadaan fase pertumbuhan, ditandai dengan meningkatnya populasi bakteri secara berkelanjutan. Bahan baku ikan lele sebagai media untuk pertumbuhan bakteri masih mempunyai nutrisi kompleks, sehingga menunjang untuk fase pertumbuhan bakteri. Selama fermentasi juga dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan khamir.

Dari pengamatan yang dilakukan, pertumbuhan khamir/kapang tidak terdeteksi. Walaupun ada beberapa spesies khamir seperti *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii*, dan *Wallemia ichthyophaga* yang mampu tumbuh hingga konsentrasi NaCl 3,0 M (Norkrans

1966; Prista *et al.*, 2005), 5,0 M (Plemenitas *et al.*, 2008), dan 5,2 M (Zalar *et al.*, 2005). Hal ini disebabkan kondisi inkubasi selama fermentasi dalam keadaan mikroaerofilik. Sifat pertumbuhan BAL yang mendominasi dan bakteri memproduksi bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan khamir. Bakteriosin didefinisikan sebagai senyawa antimikrobia yang disintesis oleh berbagai spesies bakteri termasuk kelompok bakteri asam laktat (BAL) di dalam ribosom. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memperlihatkan aktivitas antibakteri (bakterisida ataupun bakteristatik) terhadap spesies bakteri yang bersifat sensitif. Protein ini seringkali aktif melawan spesies lain yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan mikroorganisme penghasil (Klaenhammer, 1988; Kaiser *et al.*, 1993 dalam Galvez *et al.*, 2007).

2. Isolasi dan Identifikasi BAL

Pada tahap isolasi dan pemurnian dipilih berdasarkan koloni yang menghasilkan zona jernih pada media MRS yang ditambah kalsium karbonat (CaCO_3) 1%. Kalsium karbonat berfungsi sebagai buffer sekaligus seleksi awal pada bakteri penghasil asam laktat. Asam laktat akan menyebabkan zona jernih disekeliling koloni karena melarutkan kalsium karbonat sehingga dapat digunakan sebagai penanda awal koloni bakteri asam laktat (Seelly *et al.*, 2001). Pemilihan awal isolat berdasarkan zona jernih, bentuk dan ukuran koloni, untuk ditumbuhkan pada medium yang sama dengan medium goresan. Pemurnian dilakukan hingga diperoleh isolat murni.

Hasil isolasi diperoleh 6 isolat bakteri asam laktat dengan karakteristik disajikan dalam Tabel 2. Semua isolat berbentuk bulat (kokus), menghasilkan koloni dengan zona jernih pada media MRS yang ditambah kalsium karbonat 1%, bentuk sel berpasangan/tetrad, dan reaksi pengecatan Gram positif sebagai penanda awal isolat bakteri asam laktat.

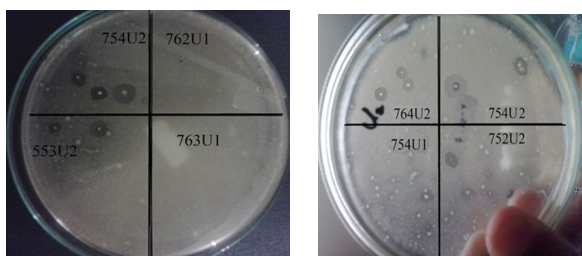
Tabel 2. Perbandingan Karakteristik Fenotifik Kelompok BAL yang Diisolasi dari Kecap Ikan Lele dengan Genus *Pediococcus* dan *Leuconostoc*

karakteristik isolate	kode isolate							<i>Pediococcus</i> ^a	<i>Leuconostoc</i> ^a
	553 U ₂	752 U ₂	754 U ₁	754 U ₂	757 U ₂	764 U ₂			
Morfologi sel									
Sel bulat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tunggal/rantai	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Berpasangan/tetrad	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Reaksi Gram	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CO ₂ dari glukosa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Produksi katalase	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Pertumbuhan pada kadar garam dan protein :									
NaCl 6,5 %								±	±
NaCl 7 %	+	+	+	+	+	+	+		
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-		
NaCl 7 % + protein 0%	-	-	-	-	-	-	-		
NaCl 7 % + kasein 2 %	+	+	+	+	+	+	+		
Pertumbuhan pada suhu berbeda :									
10° C								±	+
15° C				-			-		
45° C				+			+	±	-
50° C				-			-		
Pertumbuhan pada pH berbeda :									
pH 4,2				+			+		
pH 4,4								+	±
pH 8,0								±	-
pH 8,5				+			+		

Ket: ^a sumber: Axelson (1983) dalam Salminen dan Wright (1983)

(+): positif +: tumbuh
 (-): negatif -: tidak tumbuh
 ±: respon variasi antar spesies

Isolat yang diduga sebagai bakteri asam laktat kemudian diuji kemampuannya menghasilkan enzim protease pada media agar mengandung kasein. Hasil pengujian terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat yang Membentuk Zona Jernih pada Media Agar + Kasein

Karakter kimiawi menunjukkan semua isolat tidak menghasilkan enzim katalase (katalase negatif). Enzim katalase diproduksi oleh beberapa genus bakteri seperti: Genus *Staphylococcus* sp, *Micrococcus* sp, dan *Listeria* sp. Hasil respirasi aerobik bakteri memproduksi komponen H₂O₂. Penumpukan senyawa peroksida dapat menghasilkan radikal bebas bersifat toksik, yang selanjutnya akan merusak membran sel dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sehingga bakteri melakukan mekanisme perlindungan diri dengan memproduksi enzim katalase. Enzim ini berfungsi untuk memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Sedangkan enzim katalase tidak

diproduksi oleh bakteri anaerob obligat atau bakteri yang bersifat mikroaerofil.

Selanjutnya isolat ditumbuhkan pada media yang mengandung kadar garam 7% dan media tanpa kadar garam. Dari hasil pengamatan isolat hanya tumbuh pada media yang mempunyai kadar garam 7%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bersifat halofil, yaitu isolat hanya mampu tumbuh pada lingkungan yang mempunyai kadar garam. Pengujian isolat bersifat proteolitik dilakukan secara kualitatif, ditumbuhkan pada media yang mengandung protein (kasein 2%) dan media tanpa protein. Dari penelitian didapatkan bahwa isolat hanya mempunyai kemampuan tumbuh pada media yang mengandung protein, serta membentuk zona jernih di sekitar koloni seperti terlihat pada.

Isolat dengan kode 762U₂ dan 763U₁ tidak mempunyai kemampuan tumbuh pada media agar + kasein, sehingga isolat bukan termasuk bakteri yang bersifat proteolitik. Sedangkan isolat dengan kode 754U₂ dan 553U₂ mempunyai kemampuan tumbuh dan menghasilkan zona jernih pada media agar + kasein, sehingga isolat dapat digolongkan pada kelompok bakteri yang bersifat proteolitik. Keempat isolat (764U₂, 754 U₂, 752 U₂, dan 754 U₂) seperti pada Gambar 1. juga termasuk bakteri yang bersifat proteolitik. Pengujian juga dilakukan, dengan menumbuhkan isolat pada media dengan variasi suhu (15, 45, dan 50°C), dan pH (4,2 dan 8,5). Semua isolat tidak dapat tumbuh pada suhu 15°C dan 50°C, tetapi pada suhu 45°C, kedua isolat mampu tumbuh pada pH 8,5 dan 4,2. Karakteristik kedua isolat bakteri asam laktat tersebut dikaji berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994) dengan melihat sifat-sifat fenotip yang muncul berdasarkan karakter, diduga kuat termasuk genus *Pediococcus* sp.

KESIMPULAN DAN SARAN

Selama fermentasi kecap ikan lele telah berhasil didapatkan 6 isolat BAL yang bersifat halofil dan mampu menghasilkan enzim proteolitik, teridentifikasi sebagai genus *Pediococcus* sp. Genus *Pediococcus* sp tersebut merupakan BAL halofil proteolitik yang tumbuh

selama fermentasi kecap ikan lele dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat kultur starter kecap ikan.

Berpedoman pada hasil penelitian yang diperoleh maka dapat disarankan sebagai berikut: Perlu dilakukan kajian karakteristik fenotif yang lebih mendalam dari isolat BAL tersebut, sehingga dapat diidentifikasi pada tingkat spesies. Untuk dapat digunakan sebagai kultur starter kecap ikan, perlu dilakukan uji potensi dan uji produksi enzim proteolitik dari isolat yang telah berhasil diisolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto E, Liviawaty E. 1996. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Buckle KA, Edwards RA, Fleet GH, Wootton M. 1987. *Ilmu Pangan*. (diterjemahkan oleh Purnomo H, Adiono). Jakarta: UI-Press.
- Eyo AA. 2001. *Fish Processing Technology in the Tropics*. New Bussa: University of Ilorin Press.
- Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Omar NB. 2007. Bacteriocin-based strategies for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. (120): 51-70.
- Hasnan M. 1991. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Holt JG, Krieg NL, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. USA: Williams and Wilkins Baltimore.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. (70): 337-349.
- Norkrans B. 1966. *Studies on Marine Occurring Yeasts: Growth Related to pH, NaCl Concentration and Temperature*. *Archives of Microbiology*(54):374-392.
- Oktaviani R. 2015. Pemanfaatan Limbah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) pada Pembuatan Kecap Ikan Lele (*Clarias* sp). *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Teknologi dan Industri Pangan, Universitas Slamet Riyadi.
- Orejana. 1982 dalam Hasnan. 1991. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan. *Skripsi*.

- Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Plemenitas A, Vaupotic T, Lenassi M, Kogej T, Gunde CN. 2008. *Adaptation of Extremely Halotolerant Black Yeast Hortaea werneckii to Increased Osmolarity: a Molecular Perspective at a Glance*. *Studies in Mycology* (61): 67-75.
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, Garcia R, Ramos J. 2005. *Mechanisms underlying the Halotolerant Way of Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*(5):693-701.
- Seely HW, Vanden Mark PW, Lee JJ. 2001. *Microbes in Action. A Laboratory Manual of Microbiology*. 4 edition. New York. W.H. Freeman and Comp. 265-266.
- Subroto W, Hutuely L, Haerudin NH, Purnomo AH. 1985 dalam Hasnan. 1991. Pengaruh Penggunaan Enzim Papain selama Proses Hidrolisis Kecap Ikan. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.