

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
PENGHASIL RIBOFLAVIN DARI SAWI ASIN TERFERMENTASI**

(Skripsi)

Oleh

VYNA AYU RAMADIAN SAPUTRI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRAK

ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) PENGHASIL RIBOFLAVIN DARI SAWI ASIN TERFERMENTASI

Vyna Ayu Ramadian S

Bakteri asam laktat merupakan suatu mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit, salah satunya yaitu vitamin B₂ atau riboflavin. Produk fermentasi berupa sawi asin merupakan salah satu pangan fermentasi yang memiliki potensi eksplorasi bakteri asam laktat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri asam laktat dari sawi asin dan karakteristik isolat yang menghasilkan riboflavin tertinggi. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan delapan isolat dari hasil isolasi bakteri asam laktat dari sawi asin dengan kadar riboflavin tertinggi yang dihasilkan adalah sebesar 5.21 mg/L dari isolat 5 dengan kode S-3-3 dan 6.11 mg/L oleh isolat 7 dengan kode S-5-2. Karakter morfologi koloni dan sel bakteri dianalisis secara kualitatif pada isolat S-3-3 dan S-5-2. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa isolat yang didapatkan merupakan gram positif, bersifat non motil serta pada isolat S-3-3 berbentuk batang dan isolat S-5-2 berbentuk bulat. Pengujian antimikroba pada kedua isolat menggunakan bakteri patogen *E.coli* dengan metode *disc diffusion* menunjukkan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang digunakan. Untuk isolat S-5-2 memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat sebesar 2.6 dan pada isolat S-3-3 sebesar 1.5.

Kata Kunci : Isolasi, Bakteri Asam Laktat, Riboflavin, Sawi Asin, Uji Antimikroba.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RIBOFLAVIN PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA (LAB) FROM FERMENTED SALTED MUSTARD

Vyna Ayu Ramadian S

Lactic acid bacteria are capable to produce metabolites, such as vitamin B₂ or Riboflavin. As fermented food, salted mustard is potentially to be explored of its lactic acid bacteria. This study was aimed to find out the isolates of lactic acid bacteria from salted mustard and get the characteristics of isolates that produce the highest riboflavin. The isolation of lactic acid bacteria from fermented salted mustard generated eight isolates with the highest riboflavin production were 5,21 mg/L from isolate 5 and 6,11 mg/L from isolate 7. The isolates were named as S-3-3 and S-5-2, respectively. The morphological characterization showed that S-3-3 was rods-shaped (*Bacil*) while S-5-2 was spherical (*Coccus*) both isolates was gram positive and non motile. Antimicrobial tests on both isolates forward *E.coli* by disc diffusion method indicated the ability to inhibit the growth of *E. coli*. The S-5-2 isolates showed inhibitory activity for 2,6 stronger than S-3-3 which generated inhibitory activity for 1,5.

Keywords: Isolation, Lactic Acid Bacteria, Riboflavin, Fermented Salted Mustard, Antimicrobial Test.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
PENGHASIL RIBOFLAVIN DARI SAWI ASIN TERFERMENTASI**

Oleh

Vyna Ayu Ramadian S

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDARLAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) PENGHASIL RIBOFLAVIN DARI SAWI ASIN TERFERMENTASI**

Nama Mahasiswa : *Oyna Ayu Ramadian Saputri*

No. Pokok Mahasiswa : 1317011075

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Ketua Jurusan Kimia

Pembimbing

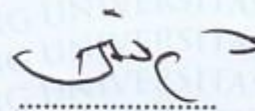
Dr. Eng. Surtpto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

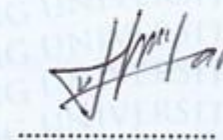
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

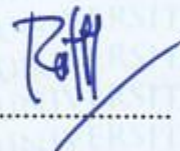
Ketua : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Nurhasanah, M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP. 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **31 Januari 2018**

RIWAYAT HIDUP



Vyna Ayu Ramadian Saputri dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 22 Juli 1995, sebagai anak pertama dari dua bersaudara, putri dari Pujo Krustono, S.P. dan Dewi Sahara.

Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanan di TK Pertiwi 2 Bandar Lampung, pendidikan dasar di SD Negeri 1 Teluk Betung diselesaikan pada tahun 2007 Pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 16 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2010, dan pendidikan menengah atas di SMA Perintis 2 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2013. Tahun 2013, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung (Unila) melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk perguruan Tinggi Negeri) .

Pada tahun 2016 Penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari dari bulan Juli sampai Agustus 2016. di Desa Cimarias, Kec. Bangun Rejo, Kab. Lampung Tengah. Tepat pada tahun 2017 Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila di Bandar Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum

Kimia Dasar jurusan S1 Teknologi Hasil Pertanian periode 2015/2016 , Kimia Dasar jurusan S1 Teknologi Pertanian 2015/2016, Kimia Dasar S1 jurusan Kehutanan 2016/2017, Biokimia Umum jurusan S1 Biologi dan jurusan S1 Teknologi Hasil Pertanian periode 2017/2018. Penulis juga aktif di organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Unila sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2013/2014, anggota Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi HIMAKI periode 2014/2015 – 2015/2016.

*“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.
Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka
apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah
bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada
Tuhanmulah engkau berharap.”*
(QS. Al-Insyirah, 6-8)

Setiap aku merasa beruntung, bisa jadi itu adalah satu
dari ribuan doa ibuku yang dikabulkan ALLAH...

“orang yang percaya diri bukanlah orang yang yakin
pada kemampuannya tetapi orang yang yakin bahwa
Allah bersamanya” (dr. Gamal Albinsaid)

“Kemenangan yang seindah-indahnya dan
sesukar-sukarnya yang boleh direbut oleh
manusia ialah menundukan diri sendiri” (Ibu
Kartini)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Dengan Rahmat Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang
Kupersembahkan Karya Sederhanaku ini sebagai wujud sayang, bakti dan
tanggung jawab*

Kepada:

Kedua orang tuaku

*Bapakku Pujo Krustono, S.P. dan Mamaku Dewi Sahara
tercinta dan tersayang,*

Adikku tersayang

Kevin Marcel Vikanio

Segenap Keluarga besarku yang selalu mendoakan keberhasilanku,

Pembimbing Penelitianku, Bapak Mulyono, Ph.D.

Guru-guru dan Dosen-Dosen yang selalu membagi ilmunya untukku

Sahabat-sahabat terbaik yang berjuang bersamaku

dan Almamater tercinta

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji hanya milik Allah SWT yang telah memberikan begitu banyak nikmat, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **”Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Riboflavin dari Sawi Asin Terfermentasi”** sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan. Namun, dengan kehendak Allah SWT maka skripsi ini terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa terselesaikannya penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang sangat aku cintai, mamaku Dewi Sahara dan bapakku Pujo Krustono, S.P., serta adikku Kevin Marcel vikanio yang telah memberikan kasih sayang, do’a, dukungan, semangat dan motivasi serta menantikan keberhasilanku.

2. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku pembimbing utama yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan, gagasan, bantuan, dukungan, semangat, kritik dan saran kepada penulis dalam proses perencanaan dan pelaksanaan penelitian serta dalam penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si. selaku pembahas pertama yang telah memberikan kritik, saran dan arahan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
4. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna selaku pembahas kedua yang telah memberikan semangat, kritik, saran dan bimbingan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
5. Prof. Suharso, Ph.D., selaku Pembimbing Akademik atas kesediaannya untuk memberikan bimbingan, bantuan, nasehat dan informasi yang bermanfaat kepada penulis.
6. Prof. Warsito, D.E.A., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung, yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
7. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M. T., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini
8. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku Kepala Laboratorium Biokimia yang telah memberikan izin dan bantuannya untuk menggunakan segala fasilitas yang berada di dalam Laboratorium Biokimia

9. Seluruh dosen dan staff administrasi di Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membantu, mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan yang sangat berguna kepada penulis selama kuliah.
10. Keluarga besarku yang selalu memberikan motivasi, dukungan dan doa untuk keberhasilanku.
11. Kesayangan-kesayangan yang sungguh luar biasa tak henti membantu, menyemangatiku, memberikan saran serta membagi bahagia dan kesedihannya selama 4 tahun ini yaitu “Brambang” Siti Nabilla Shofa, S.Si , Widya Aryani M, S.Si, Melia Tri Anggraini, Monica Dhamayanti dan Prasetyaning Tyas Chakti, S.Si. Semoga Allah selalu memberikan rahmat-Nya untuk keberhasilan kita
12. Teman- temanku “Sambalado” Fika, Mia, Kiki, Esti, Melia, Monica, Nabilla, Widya dan Vyna terimakasih untuk segala keceriaan, waktu, ilmu, pengalaman dan ‘cerita- cerita’ yang telah dibagikan.
13. Teman- Teman peergroup Biokimia Mia Permatasari, Sinta Dewi O, Fathaniah Sejati, Maya Retna Sari, Khomsatun Khasanah, Ezra Rhienzky, Sri Wahyuni. Terima kasih atas bantuan, canda, tawa, motivasi yang diberikan selama penelitian kepada penulis.
14. Mulyono’s *Research Group* Melia Tri Anggraini, Monica Dhamayanti, Prasetyaning Tyas Chakti, Ryan Wahyudi dan Shelta Mei Inorisa. Terimakasih atas kerjasama, motivasi dan keceriaannya.
15. Mba Ajeng Ayu Miranti, S.Si yang selalu membantu dan memberikan masukan hingga penulis menyelesaikan penelitiannya.

16. Kakak-Kakak BIOKIM tempatku bertanya mbk Arum., S.Farm, Putri Amalia., M.Si., Ana Febrilanti W., S.Si , Aprilia Isma D., S.Si , Uswatun Khasanah., S.Si, Rizky Putri Yana., S.Si, Syathira Assegaf., S.Si, Fifi Ardhyanti., S.Si , Diani Iska M,S.Si, Ayu Imani, Meta Fosfi, Kak Aziez, Rizal Rabbani, Terima kasih atas bantuan, saran, motivasi yang diberikan selama penelitian kepada penulis.
17. Adik-adik peergroup BIOKIMIA 2014, Semangat Penelitiannya.
18. Teman-teman Kimia angkatan 2013, Aulia, Badiatul, Dewi Rumondang, Fatimah, Fera, Fika, Hermayana, Khalimatus, Indah, Yudha, Esti, Kiki, Nova, Linda, Lulu, Anita, Dona, Megafit, Mawar, Nabilla, Renita, Siti, Tya, Yulia, Uut, Vero, Widya, Yunitri, Della, Eky, Yuvica, Inggit, Awan, Vicka, Arief, Oci, Maya, Nora, Atun, Diki, Shela, Vyna, Bara, Padila, Wahyuni, Kurnia, Yolanda, Murnita, Nurma, Erva, Ismi, Eka Oso, Febri, Paul, Fentri, Riska, Eka, Shelta, Nia, Nurul, Ana, Nita, Anggi, Gesa, Tika, Yuni, Celli, Riyan, Anggun, Radho, Arni, Sinta, Anton, Melita, Melia, Monica, Citra, Kartika, Ezra, Ridho, Yunita, Verdi, Korina, Doddy, dan Amha.
19. *Team* KKN Desa Cimarias dan Purwodadi Kec. Bangun Rejo Kab.Lampung Tengah. Bang Dedi, Indra (Kordes), Erick, My Dori, Yona Annisa (Ibu periku), Mba Disti, Melia, Shiska dan Gagah. Terimakasih sudah menjadi pendatang yang sangat berkesan. Semoga persaudaraan ini tetap terjaga.
20. Kakak dan adik tingkat penulis : 2010, 2012, 2013, 2014, dan 2015.

21. Sahabat-sahabatku yang selalu saling mendukung dalam kata tak terduga dan saling mendoakan mendoakan walau terbatas jarak, Hermawan, Nana Pratiwi, Nurul Aini, Heny Eka Wahyuni, Sarah Yusmiarosa, Heny Dwi Wahyuni, dan Muhammad Fadjri Givari terimakasih sudah menemani perjalanan ini sejak dulu dan semoga terus berlanjut hingga bertahun-tahun kedepan.
22. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memiliki nilai guna khususnya rekan-rekan mahasiswa dan pembaca pada umumnya. Amin.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis,

Vyna Ayu Ramadian Saputri

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Sawi asin.....	5
B. Fermentasi.....	8
C. Bakteri.....	10
D. Klasifikasi bakteri.....	14
E. Identifikasi bakteri	18
F. Bakteri asam laktat (BAL).....	20
G. Karakteristik bakteri asam laktat	21
H. Vitamin	22
I. Vitamin B ₂ (Riboflavin)	24
J. Spektrofotometri Uv-Vis	28
K. Antibiotik.....	31
L. Mekanisme kerja antibakteri.....	32
III. METODOLOGI PENELITIAN	34
A. Waktu dan tempat penelitian	34
B. Alat dan bahan	34
C. Prosedur penelitian	35
1. Tahap persiapan	35
a. Persiapan alat.....	35
b. Pembuatan medium serapan agar	35
2. Isolasi BAL dari sawi asin	35
3. Skrining BAL dari sawi asin	36
4. Produksi riboflavin dari isolat	36
5. Pembuatan kurva pertumbuhan.....	36

6. Analisis kadar riboflavin oleh BAL	37
7. Karakterisasi isolat bakteri asam laktat.....	37
a. Pewarnaan gram	38
b. Uji motilitas.....	38
c. Uji antibakteri.....	39
D. Diagram alir prosedur penelitian	40
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
A. Isolasi dan Skrining BAL Penghasil Riboflavin	41
B. Analisis Konsentrasi Riboflavin dari Isolat Terpilih.....	44
C. Kurva Pertumbuhan Isolat BAL Penghasil Riboflavin.....	49
D. Uji Antimikroba.....	51
E. Identitas BAL Penghasil Riboflavin.....	54
V. KESIMPULAN DAN SARAN	58
A. Kesimpulan.....	58
B. Saran	59

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia sawi untuk setiap 100 gr bahan.....	7
2. Karakteristik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.....	17
3. Data hasil isolasi bakteri asam laktat dari sawi asin terfermentasi.....	42
4. Nilai absorbansi larutan standar riboflavin	45
5. Konsentrasi riboflavin dari delapan isolat terpilih	73
6. Data konsentrasi riboflavin dengan waktu inkubasi 72 jam dengan waktu sampling 12 jam isolat S-3-3 dan S-5-2 pada panjang gelombang 444nm.....	76
7. Data jumlah sel isolat S-3-3 dan S-5-2 dengan waktu inkubasi 72 jam dengan waktu sampling 12 jam pada panjang gelombang 600nm.....	77
8. Data hubungan antara konsentrasi riboflavin dan jumlah sel dengan waktu inkubasi 72 jam isolat S-3-3 dan isolat S-5-2.....	78
9. Hasil karakterisasi isolat S-3-3 dan S-5-2	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sawi asin fermentasi.....	7
2. Bakteri	11
3. Kurva pertumbuhan bakteri	13
4. Struktur kimia riboflavin.....	25
5. Skema kerja spektrofotometri UV-Vis	29
6. Tahapan penelitian.....	40
7. Skrining metode <i>streak plate</i> (a) S-2-1 (b) S-2-3 (c) S-3-1 (d) S-3-2 (e) S-3-3 (f) S-5-1 (g) S-5-2 (h) S-5-3.....	43
8. Delapan isolat bakteri asam laktat terpilih.....	44
9. Kurva standar riboflavin.....	46
10. Konsentrasi riboflavin dari delapan isolat terpilih.....	47
11. Dua isolat setelah 3 hari inkubasi (a) Isolat S-3-3 (b) Isolat S-5-2	48
12. Diagram perubahan konsentrasi riboflavin pada isolat S-3-3 dan S-5-2 dengan waktu inkubasi 72 jam	48
13. Kurva pertumbuhan sel isolat S-3-3 dan S-5-2 72 jam pada λ 600 nm	49
14. Kurva hubungan antara konsentrasi riboflavin dan jumlah sel dengan waktu inkubasi 72 jam Isolat S-3-3.....	50
15. Kurva hubungan antara konsentrasi riboflavin dan jumlah sel dengan waktu inkubasi 72 jam isolat S-5-2.....	51

16. Uji antimikroba isolat bakteri asam laktat terhadap <i>E. coli</i> (a) isolat S-3-3 (b) isolat S-5-2	53
17. Uji motilitas isolat bakteri asam laktat (a) isolat S-3-3 (b) isolat S-5-2	55
18. Hasil pewarnaan gram isolat isolat S-3-3	56
19. Hasil pewarnaan gram isolat isolat S-5-2	56
20. Hasil isolasi bakteri asam laktat dari sumber isolat berupa fermentasi sawi asin kedua	68
21. Hasil isolasi bakteri asam laktat dari sumber isolat berupa fermentasi sawi asin ketiga	68
22. Hasil isolasi bakteri asam laktat dari sumber isolat berupa fermentasi sawi asin kelima	69

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pangan fermentasi merupakan produk pangan yang melibatkan mikroorganisme dalam proses pembuatannya. Pangan terfermentasi merupakan hasil aktifitas berbagai spesies mikroorganisme, seperti bakteri, khamir dan kapang.

Kemampuan mikroba dalam mengubah karbohidrat melalui proses katabolisme menjadi asam laktat, asam asetat, alkohol dan senyawa-senyawa lainnya menyebabkan mikroba menjadi demikian penting bagi manusia untuk menghasilkan produk pangan yang bergizi serta tidak mudah rusak (Fardiaz, 1992). Selain hal tersebut, produk dari pangan fermentasi sangat bervariasi dan berpeluang besar untuk dimanfaatkan pada berbagai bidang. Seperti pada bidang kesehatan beberapa produk hasil dari fermentasi pangan mengandung lebih banyak prebiotik yang dapat melancarkan pencernaan. Selain prebiotik, salah satu produk yang dapat diperoleh melalui proses fermentasi adalah vitamin. Vitamin, menjadi salah satu unsur penting bagi tubuh namun hanya dapat disintesis dalam jumlah terbatas sehingga perlu diperoleh dari luar tubuh (Shimizu, 2001). Vitamin selain dapat berasal langsung dari makanan-makanan yang menjadi sumber vitamin juga dapat berasal dari produk hasil fermentasi.

Vitamin menjadi senyawa kimia yang sangat esensial yang walaupun tersedianya di tubuh dalam jumlah demikian kecil serta tidak dapat disintesis, namun diperlukan sekali bagi kesehatan dan pertumbuhan tubuh yang normal. Vitamin berfungsi dalam beberapa tahap reaksi metabolisme energi, pertumbuhan, dan pemeliharaan tubuh, pada umumnya sebagai koenzim atau sebagai bagian dari enzim (Le Blanc *et al.*, 2011). Vitamin dapat disintesis oleh mikroorganisme dan tanaman. Belakangan ini telah dilakukan produksi vitamin melalui proses bioteknologi menggunakan mikroorganisme seperti Bakteri Asam Laktat (BAL). Vitamin B₂ (Riboflavin) menjadi salah satu jenis vitamin yang dapat diproduksi oleh BAL (Shimizu, 2001).

Vitamin B₂ (Riboflavin) berperan sebagai salah satu komponen koenzim flavin mononukleotida (FMN) dan flavin adenine dinukleotida (FAD) di dalam tubuh. Kedua enzim ini berperan penting dalam regenerasi energi bagi tubuh melalui proses respirasi. Vitamin ini juga berperan dalam pembentukan molekul steroid, sel darah merah, dan glikogen, serta menyokong pertumbuhan berbagai organ tubuh, seperti: kulit, rambut, dan kuku (Andarwulan, 1990). Riboflavin dapat ditemukan pada beberapa produk makanan dan pangan fermentasi. Salah satu jenis pangan fermentasi yang melibatkan BAL dalam proses pembuatannya yaitu sawi asin.

Sawi (*Brassicaceae*) adalah salah satu komoditas pangan hortikultura Indonesia yang mudah rusak. Salah satu alternatif dalam mengatasi resiko kerusakan sawi adalah dengan menggunakan fermentasi. Fermentasi pada pembuatan sawi asin merupakan fermentasi spontan. Fermentasi spontan adalah fermentasi yang tidak

dilakukan penambahan mikroorganisme tertentu secara sengaja. Mikroorganisme yang muncul dapat berasal dari permukaan sawi pahit, udara, bahan perendam, peralatan, atau bahan-bahan lain yang digunakan. Mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi sawi asin biasanya didominasi oleh bakteri asam laktat (BAL). Secara alami, bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi sawi asin adalah *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, dan *Pediococcus cereviceae* (Sadek, 2008).

Pemanfaatan BAL pada bahan makanan dikarenakan asam laktat disebut sebagai *food grade microorganism* yang merupakan mikroba yang tidak beresiko terhadap kesehatan karena tidak menghasilkan racun berbahaya pada bahan pangan melainkan memiliki fungsi sebaliknya yang baik bagi kesehatan.

Penelitian tentang isolasi BAL telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu (yoghurt, keju, dadih) serta pada berbagai produk pangan fermentasi, (tape, tempe, beer) (Wibowo *et al.*, 1988). Isolasi BAL dari buah-buahan dan sayur-sayuran tropis pada saat ini belum banyak dilakukan, seperti pada sawi yang terfermentasi (sawi asin) yang dianggap potensial sebagai sumber BAL.

Menurut Ikrimah *et al.* (2013) bahwa terdapat bakteri asam laktat pada sawi asin, yang memiliki manfaat yang besar, antara lain mampu menghasilkan vitamin B₂ (riboflavin). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari sawi asin terfermentasi yang dapat menghasilkan riboflavin serta mengidentifikasi karakteristik bakteri asam laktat yang diperoleh.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan isolat bakteri asam laktat dari sawi asin.
2. Mendapatkan isolat bakteri asam laktat terbaik dari sawin asin yang mampu menghasilkan riboflavin.
3. Mengidentifikasi karakteristik isolat bakteri asam laktat dari sawin asin yang menghasilkan riboflavin.
4. Mengetahui kemampuan isolat bakteri asam laktat terpilih yang memiliki daya antimikroba.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah mampu mengetahui informasi karakteristik bakteri asam laktat yang didapat dari sumber isolat berupa sawi asin fermentasi yang mampu menghasilkan riboflavin yang sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut dalam bidang bioteknologi pangan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sawi Asin

Sawi (*Brassicaceae*) adalah salah satu komoditas pangan hortikultura Indonesia yang mudah rusak. Salah satu alternatif dalam mengatasi resiko kerusakan sawi adalah dengan menggunakan fermentasi. Dalam hal ini, jenis sawi yang digunakan adalah sawi pahit (sawi jabung, sawi daging, *Brassica juncea*, *Chinese mustard*). Sawi pahit biasa digunakan dalam bentuk terfermentasi di Indonesia, tidak dimanfaatkan dalam bentuk lain. Di Cina, sawi pahit merupakan komoditas sayur yang berharga dan digunakan hampir di seluruh daerahnya (Ren *et al.*, 1995). Dalam pembuatan sawi asin, bahan-bahan yang digunakan adalah sawi pahit, air, tepung beras, garam, dan gula. Untuk 1 kg sawi pahit, dibutuhkan bahan perendam berupa 500 cc air yang telah ditambahkan 1 sendok teh (sdt) tepung beras, 2 sendok makan (sdm) garam, dan 1 sdm gula pasir, proses pembuatan sawi terfermentasi sendiri dapat berlangsung selama 3-4 hari perendaman sesuai keasaman yang diinginkan

Bahan perendam yang digunakan dapat pula berupa air pekat yang diambil dari air untuk menanak nasi (air tajin). Menurut Sadek *et al.*, (2009), penambahan air tajin yang dikombinasikan dengan 3% garam akan menghasilkan sawi asin dengan mutu organoleptik lebih baik dibanding tanpa penambahan air tajin. Selain itu,

sawi asin akan memiliki penampakan warna hijau muda, berasa asin, beraroma khas sawi asin, dan bertekstur renyah. Fermentasi sawi pahit bertujuan untuk mengawetkan sawi pahit sekaligus memberikan perubahan rasa, warna, bentuk yang menarik.

Sawi pahit yang dibuat dengan proses fermentasi tersebut memiliki kandungan yang tinggi pada serat, vitamin (B1, B2, B6, C, dan E), karoten, klorofil, dan mangan. Secara umum, komposisi kimia sawi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia sawi untuk setiap 100 gr bahan.

Kandungan	Satuan	Jumlah
Air	(g)	92.20
Protein	(g)	2.30
Lemak	(g)	0.30
Karbohidrat	(g)	4.00
Kalsium	(mg)	220.00
Fosfor	(mg)	38.00
Besi	(mg)	2.90
Vitamin B2	(mg)	3.87
Vitamin B1	(mg)	0.09
Vitamin C	(mg)	102.00
Kalori	(kal)	22.00
Bagian yang dapat dimakan	(%)	87.00

(Departemen Kesehatan, 2010).

Hasil dari fermentasi sawi pahit berupa sawi asin (Gambar 1). Sawi asin dikenal juga sebagai sayur asin. Beberapa jenis sawi asin lainnya disebut *suan-tsai* atau *fu-tsai* (Taiwan), *kiam chai* (Thailand), *kiam chaye* (Malaysia), dan *Pak-Gard-Dong* (Thailand). Setiap negara memiliki perbedaan dalam pembuatan sayur asin meliputi bahan yang digunakan, cara pembuatan, atau waktu fermentasi.



Gambar 1. Sawi asin fermentasi

Fermentasi pada pembuatan sawi asin merupakan fermentasi spontan. Fermentasi spontan terjadi karena tidak dilakukan penambahan mikroorganisme tertentu secara sengaja. Mikroorganisme yang muncul dapat berasal dari permukaan sawi pahit, udara, bahan perendam, peralatan, atau bahan-bahan lain yang digunakan. Mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi sawi asin biasanya didominasi oleh bakteri asam laktat (BAL). Pada berbagai produk pangan fermentasi, BAL umum dijumpai terkait kemampuan BAL dalam menggunakan berbagai macam gula, menghasilkan laktat dan berbagai jenis asam lainnya (Hutkins, 2006). BAL merupakan istilah bakteri yang tidak resmi dan tidak terdapat dalam taksonomi prokariot. BAL didefinisikan sebagai segala jenis bakteri yang dapat memproduksi asam laktat, memiliki kandungan GC rendah, tidak membentuk spora, Gram positif batang atau kokus, toleran asam dan garam, non motil, anaerob fakultatif, dengan berbagai perbedaan pada biokimia, fisiologi, dan genetiknya (Kapoor, 2010). Pada proses fermentasi sawi asin, komunitas BAL tergantung pada kemampuan BAL beradaptasi pada bahan perendam dan melakukan metabolisme. Hasil metabolisme BAL akan memberikan perubahan rasa, bentuk maupun warna selama proses fermentasi sawi asin.

Bahan perendam dalam fermentasi sawi asin mengandung garam, tepung beras (atau air tajin), dan gula pasir. Penambahan garam pada bahan perendam diduga sebagai penyeleksi mikroorganisme halotoleran. BAL yang bersifat halotoleran mampu hidup dan mendominasi populasi pada fermentasi sawi asin. Berdasarkan sistem osmosis, kandungan garam lingkungan (bahan perendam) yang lebih tinggi akan mengakibatkan air dari dalam sel-sel sawi asin keluar. Hal ini dilanjutkan dengan penurunan aktivitas air (A_w), sehingga bakteri pembusuk tidak dapat hidup di dalam jaringan sawi asin. Zat dalam bahan perendam lain adalah tepung beras atau gula pasir berfungsi substrat awal bagi pertumbuhan BAL dalam fermentasi. Kedua zat ini digunakan BAL sebagai substrat yang mudah dimetabolisme untuk pertumbuhan awal sebelum mendegradasi struktur yang lebih kompleks seperti selulosa sawi putih.

B. Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *fervere* (Latin), yang dapat berarti mendidih, menggambarkan aksi ragi pada ekstrak buah selama pembuatan minuman beralkohol. Pengertian fermentasi agak berbeda antara ahli mikrobiologi dan ahli biokimia. Pengertian fermentasi menurut ahli biokimia yaitu proses yang menghasilkan energi dengan perombakan senyawa organik. Ahli mikrobiologi industri memperluas pengertian fermentasi menjadi segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganisme (Rahayu, 2014).

Fermentasi juga dapat diartikan sebagai suatu desimilasi senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme. Desimilasi merupakan reaksi kimia yang membebaskan energi melalui perombakan nutrient. Pada proses

disimilasi, senyawa substrat yang merupakan sumber energi diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana atau tingkat energinya lebih rendah. Reaksi disimilasi merupakan aktivitas katabolik sel (Kuswanto, 2004).

Proses fermentasi memanfaatkan aktivitas suatu mikroba tertentu atau campuran beberapa spesies mikroba. Mikroba yang banyak digunakan dalam proses fermentasi antara lain khamir, kapang dan bakteri (Steinkraus, 1985). Kemajuan dalam bidang teknologi fermentasi telah memungkinkan manusia untuk memproduksi berbagai produk yang tidak dapat atau sulit diproduksi melalui proses kimia. Teknologi fermentasi merupakan salah satu upaya manusia dalam memanfaatkan bahan-bahan yang harganya relative murah menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi dan berguna bagi kesejahteraan hidup manusia (Rahayu, 2014). Secara umum ada empat kelompok fermentasi yang penting secara ekonomi, yaitu :

1. Fermentasi yang memproduksi sel mikroba (*biomass*)

Produk komersial dari *biomass* dapat dibedakan menjadi produksi *yeast* untuk industri roti, dan produksi sel mikroba untuk digunakan sebagai makanan manusia dan hewan.

2. Fermentasi yang menghasilkan enzim dan mikroba

Secara komersial, enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan, dan mikroba, namun enzim yang diproduksi oleh mikroba memiliki beberapa keunggulan yaitu, mampu dihasilkan dalam jumlah besar dan mudah untuk meningkatkan produktivitas bila dibandingkan dengan tanaman atau hewan.

3. Fermentasi yang menghasilkan metabolit

Metabolit dapat dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder.

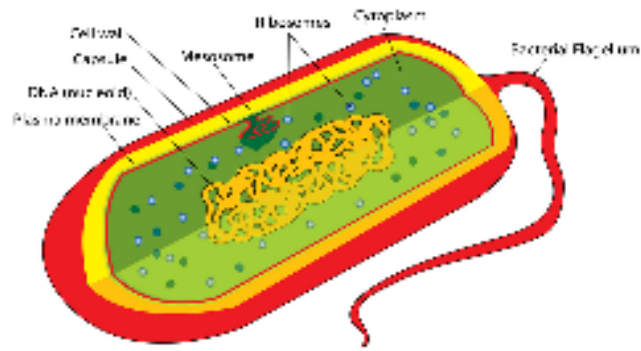
Produk metabolisme primer yang dianggap penting contohnya etanol, asam sitrat, polisakarida, aseton, butanol, dan vitamin. Sedangkan metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba contohnya antibiotik, pemacu pertumbuhan, inhibitor enzim, dan lain-lain.

4. Proses transformasi

Sel mikroba dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang masih memiliki kemiripan struktur namun memiliki nilai komersial yang lebih tinggi. Proses transformasi dengan menggunakan mikroba ini lebih baik bila dibandingkan dengan proses kimia, berkaitan dengan penggunaan reagen kimia yang lebih sedikit. Selain itu proses dapat berlangsung pada suhu rendah tanpa membutuhkan katalis logam berat yang berpotensi menimbulkan potensi (Ganjar *et al.*, 2006).

C. Bakteri

Bakteri adalah salah satu golongan organisme prokariotik (tidak memiliki selubung inti). Bakteri sebagai makhluk hidup tentu memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. Bentuk DNA bakteri adalah sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoi. Pada DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas akson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz, 2004).



Gambar 2. Bakteri (Fardiaz, 1992).

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah :

- a. Sumber energi, yang diperlukan untuk reaksi-reaksi sintesis yang membutuhkan energi dalam pertumbuhan dan restorasi, pemeliharaan keseimbangan cairan, gerak dan sebagainya.
- b. Sumber karbon
- c. Sumber nitrogen, sebagian besar untuk sintesis protein dan asam-asam nukleat
- d. Sumber garam-garam anorganik, khususnya folat dan sulfat sebagai anion dan potasium, sodium magnesium, kalsium, besi, mangan sebagai kation.
- e. Bakteri-bakteri tertentu membutuhkan faktor-faktor tumbuh tambahan, disebut juga vitamin bakteri, dalam jumlah sedikit untuk sintesis metabolik esensial (Irianto, 2006).

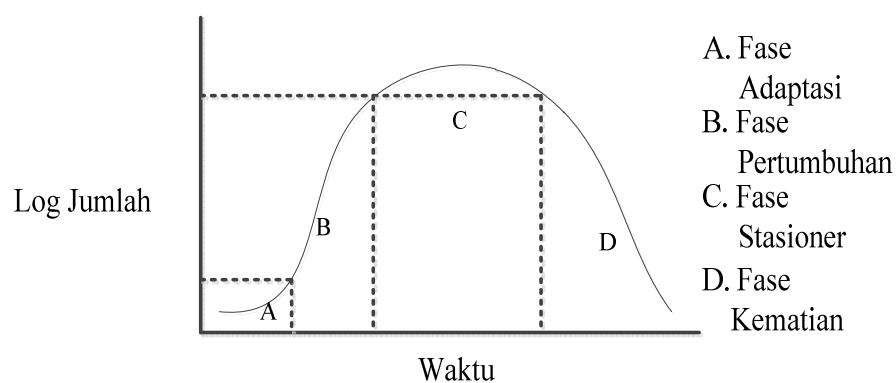
Fase Pertumbuhan Bakteri, yaitu :

- a. Fase adaptasi yaitu fase untuk menyesuaikan dengan substrat dan kondisi lingkungan disekitarnya.
- b. Fase pertumbuhan awal yaitu fase dimana sel mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah.

- c. Fase logaritmik yaitu fase dimana mikroorganisme membelah dengan cepat dan konstan.
- d. Fase pertumbuhan lambat yaitu fase dimana zat nutrisi di dalam medium sudah sangat berkurang dan adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- e. Fase pertumbuhan tetap (statis) yaitu fase dimana jumlah populasi sel yang tetap karena jumlah sel yang hidup tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati.
- f. Fase menuju kematin dan fase kematian yaitu fase dimana sebagian populasi baktei mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu zat gizi di dalam medium habis dan energi cadangan di dalam sel habis (Fardiaz, 1989)

Fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrien dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup. Fase stasioner merupakan saat laju

pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri (Volk dan Wheeler, 1993).

Untuk mendapatkan bakteri yang potensial dilakukan dengan penapisan mikroorganisme dari lingkungan. Umumnya isolat bakteri yang diperoleh sesuai dengan lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan tersebut biasanya digunakan bakteri sebagai substrat utamanya (Shahib, 2005).

Bacillus cereus merupakan bakteri Gram-positif, aerob fakultatif, dan dapat membentuk spora. Selnya berbentuk batang besar dan sporanya tidak membengkakkan sporangiumnya. Sifat-sifat ini dan karakteristik-karakteristik lainnya, termasuk sifat-sifat biokimia, digunakan untuk membedakan dan menentukan keberadaan *B. cereus*, walaupun sifat-sifat ini juga dimiliki oleh *B. cereus* var. *mycoides*, *B. thuringiensis* dan *B. anthracis*. Organisme-organisme ini dibedakan berdasarkan pada motilitas/gerakan (kebanyakan *B. cereus* motil /

dapat bergerak), keberadaan kristal racun (pada *B. thuringiensis*), kemampuan untuk menghancurkan sel darah merah (aktivitas *hemolytic*) (*B. cereus* dan lainnya bersifat *beta haemolytic* sementara *B. anthracis* tidak bersifat *hemolytic*), dan pertumbuhan *rhizoid* (struktur seperti akar), yang merupakan sifat khas dari *B. cereus* var. *Mycooides* (Boyer, 1993).

D. Klasifikasi Bakteri

Untuk memahami beberapa kelompok organisme, diperlukan klasifikasi. Tes biokimia, pewarnaan gram, merupakan kriteria yang efektif untuk klasifikasi. Hasil pewarnaan mencerminkan perbedaan dasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga dapat membagi bakteri menjadi 2 kelompok, yaitu bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif.

1. Bakteri Gram-negatif

- Bakteri Gram Negatif Berbentuk Batang (*Enterobacteriaceae*)

Bakteri gram negatif berbentuk batang habitatnya adalah usus manusia dan binatang. *Enterobacteriaceae* meliputi *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*. Beberapa organisme seperti *Escherichia coli* merupakan flora normal dan dapat menyebabkan penyakit, sedangkan yang lain seperti *Salmonella* dan *shigella* merupakan patogen yang umum bagi manusia.

- *Pseudomonas*, *Acinobacter* dan Bakteri Gram Negatif Lain.

Pseudomonas aeruginosa bersifat invasif dan toksigenik, mengakibatkan infeksi pada pasien dengan penurunan daya tahan tubuh dan merupakan patogen nosokomial yang penting .

- *Vibrio Campylobacter, Helicobacter*, dan Bakteri lain yang berhubungan. Mikroorganisme ini merupakan spesies berbentuk batang Gram-negatif yang tersebar luas di alam. *Vibrio* ditemukan didaerah perairan dan permukaan air. *Aeromonas* banyak ditemukan di air segar dan terkadang pada hewan berdarah dingin.

- *Haemophilus, Bordetella, dan Brucella*

Gram negatif *Hemophilis influenza* tipe b merupakan patogen bagi manusia yang penting.

- *Yersinia, Franscisella dan Pasteurella.*

Berbentuk batang pendek Gram-negatif yang pleomorfik. Organisme ini bersifat katalase positif, oksidase positif, dan merupakan bakteri anaerob fakultatif (Jawetz,2004).

2. Bakteri Gram-positif

- Bakteri gram positif pembentuk spora : Spesies *Bacillus* dan *Clostridium*. Kedua spesies ini terdapat dimana-mana, membentuk spora, sehingga dapat hidup di lingkungan selama bertahun-tahun. Spesies *Basillus* bersifat aerob, sedangkan *Clostridium* bersifat anaerob obligat.

- Bakteri Gram-positif Tidak Membentuk Spora: Spesies *Corynebacterium, Listeria, Propionibacterium, Actinomycetes.*

Beberapa anggota genus *Corynebacterium* dan kelompok *Propionibacterium* merupakan flora normal pada kulit dan selaput lendir.

- *Staphylococcus*

Berbentuk bulat, biasanya tersusun bergerombol yang tidak teratur seperti anggur. Beberapa spesies merupakan anggota flora normal pada kulit dan selaput

lendir, yang lain menyebabkan supurasi dan bahkan septikemia fatal.

Staphylococcus yang patogen sering menghemolisis darah, mengkoagulasi plasma dan menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler. Tipe Staphylococcus yang berkaitan dengan medis adalah *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus*.

- *Streptococcus*

Merupakan bakteri gram-positif berbentuk bulat yang mempunyai pasangan atau rantai pada pertumbuhannya. Beberapa streptococcus merupakan flora normal manusia tetapi lainnya bisa bersifat patogen pada manusia. Ada 20 spesies diantaranya; *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, dan jenis *Enterococcus* (Jawetz, 2004).

Bakteri gram negatif bersifat lebih konstan terhadap reaksi pewarnaan, tetapi bakteri gram positif sering berubah sifat pewarnaannya sehingga menunjukkan reaksi gram variabel, sebagai contoh, kultur bakteri gram positif sudah tua dapat kehilangan kemampuannya untuk menyerap pewarna violet kristal sehingga dapat menyerap pewarna safranin, dan berwarna merah seperti bakteri gram negatif. Perubahan tersebut juga dapat disebabkan oleh perubahan kondisi lingkungan atau modifikasi teknik pewarnaan (Fardiaz, 1989).

Tabel 2. Karakteristik bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.

Karakteristik	Gram positif	Gram negatif
Dinding sel	Homogen dan tebal (20-80 nm) serta sebagian besar tersusun dari peptidoglikan. Polisakarida lain dan asam teikoat dapat ikut menyusun dinding sel.	Peptidoglikan (2-7 nm) di antara membran dalam dan luar, serta adanya membran luar (7-8 nm tebalnya) yang terdiri dari lipid, protein, dan lipopolisakarida
Bentuk sel	Bulat, batang atau filamen	Bulat, oval, batang lurus atau melingkar seperti tanda koma, heliks atau filamen; beberapa mempunyai selubung atau kapsul
Reproduksi	Pembelahan biner	Pembelahan biner, kadang-kadang pertunasan
Metabolisme	kemoorganoheterotrof	Fototrof, kemolitotrof, atau kemoorganoheterotrof
Motilitas	Kebanyakan nonmotil, bila motil tipe flagelanya adalah petritrikus (petritrichous)	Motil atau nonmotil. Bentuk flagela dapat bervariasi-polar, lopotrikus (lophotrichous), petritrikus (petritrichous).
Anggota tubuh (apendase)	Biasanya tidak memiliki apendase	Dapat memiliki pili, fimbriae, tangkai
Endospora	Beberapa grup dapat membentuk endospora	Tidak dapat membentuk endospore

(Fardiaz, 1989).

E. Identifikasi Bakteri

Terdapat beberapa cara untuk identifikasi bakteri antara lain :

a. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengamati pergerakan, dan pembelahan secara biner, mengamati bentuk dan ukuran sel yang alami, yang pada saat mengalami fiksasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan.

b. Pembiakan Bakteri

Pembenihan atau media yaitu campuran bahan-bahan tertentu yang dapat menumbuhkan bakteri, jamur ataupun parasit, pada derajat keasaman dan inkubasi tertentu. Pembiakan diperlukan untuk mempelajari sifat bakteri untuk dapat mengadakan identifikasi, determinasi, atau differensiasi jenis-jenis yang ditemukan. Medium pembiakan terdiri dari :

1) Medium pembiakan dasar

Pembiakan dasar adalah medium pembiakan sederhana yang mengandung bahan yang umum diperlukan oleh sebagian besar mikroorganisme dan dipakai juga sebagai komponen dasar untuk membuat medium pembiakan lain.

Medium ini dibuat dari 3 g ekstrak daging, 5 g pepton dan 1000 ml air.

Dinamakan juga bulyon nutrisi. Dengan penambahan 15 agar-agar diperoleh apa yang dinamakan agar nutrisi atau bulyon agar.

2) Medium pembiakan penyubur (*Enriched Medium*)

Medium pembiakan penyubur dibuat dari medium pembiakan dasar dengan penambahan bahan lain untuk mempersubur pertumbuhan bakteri tertentu yang pada medium pembiakan dasar tidak dapat tumbuh dengan baik. Untuk

keperluan ini ke dalam medium pembiakan dasar sering ditambahkan darah, serum, cairan tubuh, ekstrak hati dan otak.

3). Medium pembiakan selektif

Medium pembiakan selektif digunakan untuk menyeleksi bakteri yang diperlukan dari campuran dengan bakteri-bakteri lain yang terdapat dalam bahan pemeriksaan. Dengan penambahan bahan tertentu bakteri yang dicari dapat dipisahkan dengan mudah.

c. Uji Biokimia

Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Selain itu dilihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi. Adapun uji biokimia yang sering dilakukan yaitu :

1. SIM (Sulfat Indol Motility)

Hasil yang diperoleh pada uji ini adalah positif, hal ini terlihat adanya penyebaranyang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Dari uji juga terlihat ada 15 warna hitam, yang berarti bakteri ini menghasilkan Hidrogen Sulfat (H_2S)

2. TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Triple Sugar Iron Agar medium, biasanya digunakan untuk konfirmasi pengujian *E. coli* dan dapat digunakan untuk identifikasi bakteri gram negatif yang memfermentasi dekstrosa/laktosa/sukrosa dan produksi H_2S . Dari fungsi tersebut media ini dapat diusulkan untuk konfirmasi *Salmonella* dan memisahkan dari *Pseudomonas* yang tumbuh pada media lain BSA dan BGA.

Terjadinya fermentasi dekstrosa oleh *Salmonella* akan menurunkan pH menjadi asam. Kondisi ini akan menyebabkan perubahan phenol red (media merah) menjadi kuning. Sedangkan *Pseudomonas* karena tidak mampu memfermentasi dekstrosa, maka media akan tetap berwarna merah. Dengan demikian media ini dapat dengan mudah memilah *Salmonella* dari *Pseudomonas*.

3. Simmon Sitrat

Simmon sitrat atau nama lainnya *Simmons Citrate Medium* mengandung amonium dihidrogen fosfat, natrium klorida, natrium sitrat. Magnesium sulfat, agar, bromtimol biru, aquades dan memiliki pH 6,9 (Waluyo, 2004).

F. Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam laktat (BAL) yaitu kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat, selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, 2004).

Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa termasuk didalam kelompok bakteri asam laktat bersifat homofermentatif, sedangkan Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbon dioksida dikenal dalam kelompok Bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif (Reddy *et al.*, 2008). Bakteri Asam Laktat juga menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat

bakteri patogen (Usmiati, 2012). Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin dan mempunyai aktivitas hambat besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* terdapat di dalam saluran pencernaan. Ada 2 kelompok BAL (Prescott *et al.*, 2002) yaitu :

1. Bakteri homofermentatif yaitu glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh : *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.
2. Bakteri heterofermentatif yaitu glukosa difermentasikan menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂.

G. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

BAL mempunyai karakteristik morfologi, fisiologi dan metabolit tertentu. Deskripsi secara umum dari bakteri ini adalah termasuk dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat maupun batang dan menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama memfermentasi karbohidrat (Axelsson, 2004). Lebih lanjut dinyatakan oleh Jay (1992) BAL bersifat mesofilik dan termofilik, beberapa dapat tumbuh pada suhu 5°C dan tertinggi 45°C, dapat bertahan pada pH 1,2-9,6 dan beberapa hanya dapat tumbuh pada kisaran pH yang sempit (pH 4,0-4,5). Bakteri ini termasuk mikroorganisme GRAS (*Generally Recognized as Safe*) atau golongan mikroorganisme yang aman ditambahkan dalam makanan karena sifatnya yang tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, yang dikenal dengan sebutan “*food grade microorganism*”, yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan (Alakomi *et al.*, 2000).

BAL terbagi dalam 8 genus antara lain *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, dan *Corinebacterium*. Berdasarkan tipe fermentasinya, BAL terbagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi gula sedangkan kelompok heterofermentatif menghasilkan asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetaldehida, diasetil serta senyawa lainnya (Fardiaz, 1992).

H. Vitamin

Vitamin adalah suatu senyawa organik yang terdapat di dalam makanan dalam jumlah sedikit dan dibutuhkan jumlah yang besar untuk fungsi metabolisme yang normal. Vitamin dapat larut di dalam air dan lemak. Vitamin yang larut dalam lemak adalah Vitamin A, D, E, dan K dan yang larut di dalam air adalah vitamin B dan C (Dorland, 2006).

Menurut Sunita (2004) vitamin merupakan suatu zat senyawa kompleks yang sangat dibutuhkan oleh tubuh kita yang berfungsi untuk membantu pengaturan atau proses kegiatan tubuh. Tanpa vitamin manusia, hewan dan makhluk hidup lainnya tidak akan dapat melakukan aktifitas hidup dan kekurangan vitamin dapat menyebabkan memperbesar peluang terkena penyakit pada tubuh kita. Sel darah merah, terbentuk sempurna oleh kontribusi vitamin B, C, dan E, serta asam para-amino benzoat.

Selain vitamin, tubuh juga memproduksi senyawa lain yang juga berperan dalam kelancaran metabolisme di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki karakteristik dan aktivitas yang mirip dengan vitamin sehingga seringkali disebut dengan istilah

senyawa serupa vitamin (*vitamin like substances*). Perbedaan utamanya dengan vitamin adalah senyawa ini diproduksi tubuh dalam jumlah yang cukup untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari. Beberapa senyawa ini pernah diklasifikasikan ke dalam kelompok vitamin B kompleks karena kemiripan fungsi dan sumber makanannya. Akan tetapi, secara umum peranan senyawa serupa vitamin ini tidaklah sepenting vitamin (Sharewood, 2001). Kolin (*choline*) merupakan salah satu senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa serupa vitamin. Senyawa ini dapat ditemukan di setiap sel makhluk hidup dan berperan dalam pengaturan sistem saraf yang baik dan beberapa metabolisme sel. Mioinositol (*myoinositol*) juga termasuk dalam golongan senyawa serupa vitamin yang larut dalam air. Peranannya dalam tubuh secara spesifik belum diketahui. Contoh lain dari senyawa serupa vitamin ini adalah asam para-aminobenzoat (*4-aminobenzoic acid*, PABA) yang berperan sebagai senyawa antioksidan dan penyusun sel darah merah. Karnitin (*carnitine*) merupakan senyawa lain yang berperan dalam sistem transportasi asam lemak dan pembentukan otot tubuh.

I. Vitamin B2 (Riboflavin)

Riboflavin atau vitamin B2 adalah mikronutrien yang mudah diserap, bersifat larut dalam air dan memiliki peran kunci dalam menjaga kesehatan pada manusia dan hewan. Riboflavin ini adalah komponen utama dari FAD kofaktor dan FMN, sehingga dibutuhkan oleh semua flavoproteins. Dengan demikian, vitamin B2 diperlukan untuk berbagai proses selular. Seperti vitamin B lainnya, memainkan peran penting dalam metabolisme energi, dan diperlukan untuk metabolisme lemak, badan keton, karbohidrat, dan protein. Vitamin ini juga banyak berperan dalam pembentukan sel darah merah, antibodi dalam tubuh, dan dalam

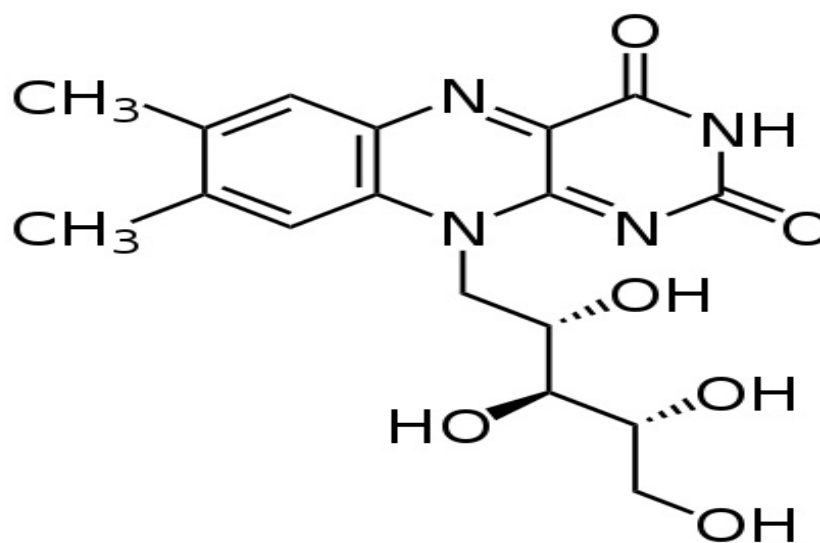
metabolisme pelepasan energi dari karbohidrat. Nama “riboflavin” berasal dari “ribosa”, kembali tulang asam ribonukleat (RNA) yang terkait dengan asam deoksiribonukleat, seperti yang ditemukan dalam DNA (dasar transkripsi genetik), dan “flavin” (yang berarti kuning. Riboflavin (vitamin B2) ditemukan sebagai pigmen kuning kehijauan yang bersifat fluoresen (mengeluarkan cahaya) dalam susu pada tahun 1879 dan fungsi biologiknya baru ditemukan pada tahun 1932. Vitamin ini disintesis pada tahun 1935 dan dinamakan riboflavin (Pauling, 1971).

1. Sifat Kimia dan Kestabilan

Struktur riboflavin terdiri atas cincin isoaloksazin dengan rantai samping ribitol yang terikat dengan gula alkohol, ribitol. Jenis vitamin ini berupa pigmen fluoresen berwarna yang relatif stabil terhadap panas tetapi terurai dengan cahaya yang visible

Bentuk aktif riboflavin adalah flavin mononukleatida (FMN) dan flavin adenin dinukleotida (FAD). FMN dibentuk oleh reaksi fosforilasi riboflavin yang tergantung pada ATP sedangkan FAD disintesis oleh reaksi selanjutnya dengan ATP dimana bagian AMP dalam ATP dialihkan kepada FMN. Flavin adenin difosfat (FAD) dibentuk bila FMN pada rantai sampingnya dikaitkan dengan adenin monofosfat. Enzim-enzim flavoprotein yang mengandung FMN dan FAD terikat pada bermacam apoenzim dan terlibat dalam reaksi oksidasi-reduksi berbagai jalur metabolisme yang berpengaruh terhadap respirasi sel. Dalam bentuk murni, riboflavin alkali kristal kuning. Riboflavin larut air, tahan panas, oksidasi dan asam, tetapi tidak tahan alkali dan cahaya terutama sinar ultraviolet. FMN dan FAD berfungsi sebagai gugus prostetik enzim

oksidoreduktase, dimana gugus prostetiknya terikat erat tetapi nonkovalen dengan apoproteinnya. Enzim-enzim flavoprotein tersebar luas dan diwakili oleh beberapa enzim oksidoreduktase yang penting dalam metabolisme mamalia, misalnya oksidase asam α amino dalam reaksi deaminasi asam amino, santin oksidase dalam penguraian purin, aldehyd dehidrogenase, gliserol 3 fosfat dehidrogenase mitokondria dalam proses pengangkutan sejumlah ekuivalen pereduksi dari sitosol ke dalam mitokondria, suksinat dehidrogenase dalam siklus asam sitrat, Asil ko-A dehidrogenase,serta flavoprotein pengalih electron dalam oksidasi asam lemak dan dihidrolipoil dehidrogenase dalam reaksi dekarboksilasi oksidatif piruvat serta α -ketoglutarat, NADH dehidrogenase merupakan komponen utama rantai respiratorikdalam mitokondria.Semua system enzim ini akan terganggu pada defisiensi riboflavin. Dalam peranannya sebagai koenzim, flavoprotein mengalami reduksi reversible cincin isoaloksazin hingga menghasilkan bentuk FMNH₂ dan FADH₂ (Akhilender, 2003)



Gambar 4. Struktur Kimia Riboflavin (Anonim, 2017).

2. Fungsi Vitamin B2

Riboflavin mengikat asam fosfat dan menjadi bagian dari dua jenis koenzim FMN dan FAD. Kedua jenis koenzim ini berperan dalam reaksi oksidasi – reduksi dalam sel sebagai pembawa hidrogen dalam sistem transpor elektron dalam mitokondria. Keduanya juga merupakan koenzim dehidrogenase yang mengkatalisis langkah pertama dalam oksidasi berbagai tahap metabolisme glukosa dan asam lemak. FMN digunakan untuk mengubah piridoksin(vitamin B6) menjadi koenzim fungsional nya, sedangkan FAD berperan dalam perubahan triptofan menjadi niasin (Guyton, 2007).

Enzim yang mengkatalisis fosforilasi riboflavin menjadi bentuk koenzim adalah flavokinase. Oleh karena koenzim ini diperlukan untuk sintesis DNA, riboflavin mempunyai pengaruh tidak langsung terhadap pertumbuhan. Enzim ini diatur oleh hormon tiroksin. Orang dewasa yang menderita kekurangan tiroksin menunjukkan kekurangan riboflavin. Berikut adalah beberapa fungsi dari vitamin B2:

- Membantu proses energi dalam tubuh manusia
Vitamin ini memiliki peranan penting dalam memberikan bantuan metabolisme atau pemrosesan lemak, karbohidrat, dan protein dalam tubuh.
- Membantu proses energi dalam tubuh manusia
Vitamin ini memiliki peranan penting dalam memberikan bantuan metabolisme atau pemrosesan lemak, karbohidrat, dan protein dalam tubuh
- Mengatur pertumbuhan dan reproduksi
Vitamin B2 juga memiliki manfaat untuk memastikan pertumbuhan serta perkembangan organ reproduksi dan pertumbuhan jaringan tubuh seperti

kulit, mata, membran mucous, sistem saraf dan kekebalan tubuh. Sebagai tambahan vitamin B2 juga menjamin kesehatan kulit, kuku dan pertumbuhan rambut.

- Meningkatkan kekebalan tubuh

Riboflavin dapat bertindak untuk memperkuat antibodi di dalam tubuh dengan memperkuat jaringan pertahanan kita terhadap bakteri penyakit yang berbahaya (Pauling 1971).

3. Metabolisme Vitamin B2

Vitamin B2 (riboflavin) banyak berperan penting dalam metabolisme di tubuh manusia. Di dalam tubuh, vitamin B2 berperan sebagai salah satu komponen koenzim flavin mononukleotida (flavin mononucleotide, FMN) dan flavin adenine dinukleotida (adenine dinucleotide, FAD). Kedua enzim ini berperan penting dalam regenerasi energi bagi tubuh melalui proses respirasi. Vitamin ini juga berperan dalam pembentukan molekul steroid, sel darah merah, dan glikogen, serta menyokong pertumbuhan berbagai organ tubuh, seperti kulit, rambut, dan kuku. Sumber vitamin B2 banyak ditemukan pada sayur-sayuran segar, kacang kedelai, kuning telur, dan susu. Defisiensinya dapat menyebabkan menurunnya daya tahan tubuh, kulit kering bersisik, mulut kering, bibir pecah-pecah, dan sariawan (Yuniastuti, 2008).

Riboflavin dibebaskan dari ikatan-ikatan protein sebagai FAD dan FMN di dalam lambung yang bersuasana asam. FAD dan FMN kemudian di dalam usus halus dihidrolisis oleh enzim-enzim pirosfosfatase dan fosfatase menjadi riboflavin bebas. Riboflavin di absorpsi dibagian atas usus halus secara aktif

oleh proses yang membutuhkan natrium untuk kemudian mengalami fosforilasi hingga menjadi FMN di dalam mukosa usus (Khomsan, 2010).

Riboflavin dan FMN dalam aliran darah sebagian besar terikat pada albumin dan sebagian kecil pada imonoglobulin G. Riboflavin dan metabolitnya terutama disimpan didalam hati, jantung dan ginjal. Simpanan riboflavin terutama dalam bentuk FAD yang mewakili 70-90% vitamin tersebut.

Konsentrasinya lima kali FMN dan lima puluh kali riboflavin. Sebanyak 200 g riboflavin dan metabolitnya dikeluarkan melalui urin tiap hari. Jumlahnya bergantung pada konsumsi dan kebutuhan jaringan. Simpanan riboflavin dalam tubuh tidak seberapa, oleh karena itu harus tiap hari diperoleh dari makanan dalam jumlah cukup (Sunita, 2004).

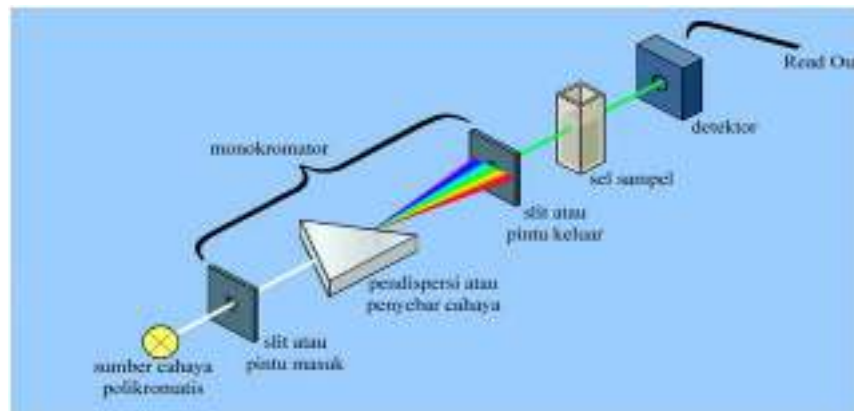
J. Spektrofotometri Uv-Vis

Spektrofotometer terdiri atas spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditranmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blangko ataupun pembanding (Khopkar, 2002).

Spektroskopi UV-Vis melibatkan absorpsi radiasi elektromagnetik dari kisaran 200-800 nm dan kemudian eksitasi elektron ke tingkat energi lebih tinggi.

Absorpsi cahaya ultraviolet/tampak oleh molekul organik terbatas hanya untuk beberapa gugus fungsi (kromofor) yang mengandung elektron valensi dari energi

eksitasi yang rendah. Spektrum UV-Vis merupakan spektrum yang kompleks dan nampak seperti pita absorpsi berlanjut, hal ini dikarenakan gangguan yang besar dari transisi rotasi dan vibrasi pada transisi elektronik memberikan kombinasi garis yang tumpang tindih (*overlapping*) (Hunger and Weitkamp, 2001).



Gambar 5. Skema kerja spektrofotometri UV-Vis (Anonim, 2017)

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet (Rohman, 2007), yaitu:

1. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum. Untuk memperoleh panjang gelombang serapan maksimum dapat diperoleh dengan membuat kurva hubungan antara absorpsi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu.

2. Pembuatan kurva kalibrasi

Dilakukan dengan membuat seri larutan baku dalam berbagai konsentrasi kemudian absorpsi tiap konsentrasi diukur lalu dibuat kurva yang merupakan

hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi. Kurva kalibrasi yang lurus menandakan bahwa hukum *Lambert-Beer* terpenuhi.

3. Pembacaan absorbansi sampel

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan. Hal ini disebabkan karena pada kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal.

Spektrofotometer UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan pelarut yang dipakai (Mulja dan Suharman, 1995), antara lain:

1. Pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna.
2. Tidak berinteraksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
3. Kemurniannya harus tinggi untuk analisis.

K. Antibiotik

Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Turunan zat-zat ini, yang dibuat secara semi-sintesis, juga termasuk kelompok ini, begitu pula senyawa sintesis dengan khasiat antibakteri (Tjay dan Rahardja, 2007).

Berdasarkan mekanisme kerjanya terhadap bakteri, antibiotik dikelompokkan sebagai berikut :

1. Inhibitor sintesis dinding sel bakteri memiliki efek bakterisidal dengan cara memecah enzim dinding sel dan menghambat enzim dalam sintesis dinding sel. Contohnya antara lain golongan β -Laktam seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, dan inhibitor sintesis dinding sel lainnya seperti vancomysin, basitrasin, fosfomysin, dan daptomysin.
2. Inhibitor sintesis protein bakteri memiliki efek bakterisidal atau bakteriostatik dengan cara mengganggu sintesis protein tanpa mengganggu sel-sel normal dan menghambat tahap-tahap sintesis protein. Obat- obat yang aktivitasnya menghambat sintesis protein bakteri seperti aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, klindamisin, oksazolidinon dan kloramfenikol.
3. Mengubah permeabilitas membran sel memiliki efek bakteriostatik dan bakteriostatik dengan menghilangkan permeabilitas membran dan oleh karena hilangnya substansi seluler menyebabkan sel menjadi lisis. Obat-obat yang memiliki aktivitas ini antara lain polimiksin, amfoterisin B, gramisidin, nistatin dan kolistin.
4. Menghambat sintesis folat mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti sulfonamida dan trimetoprim. Bakteri tidak dapat mengabsorpsi asam folat, tetapi harus membuat asam folat dari PABA (asam para amino benzoat), dan glutamat. Sedangkan pada manusia, asam folat merupakan vitamin dan kita tidak dapat menyintesis asam folat. Hal ini menjadi suatu target yang baik dan selektif untuk senyawa-senyawa antimikroba.
5. Mengganggu sintesis DNA mekanisme kerja ini terdapat pada obat-obat seperti metronidasol, kinolon, novobiosin. Obat-obat ini menghambat asam

deoksiribonukleat (DNA) girase sehingga menghambat sintesis DNA. DNA girase adalah enzim yang terdapat pada bakteri yang menyebabkan terbukanya dan terbentuknya superheliks pada DNA sehingga menghambat replikasi DNA (Stringer, 2006).

L. Mekanisme Kerja Antibakteri

Menurut Ganiswara *et al.*, (1995) mekanisme kerja dari antibakteri terjadi beberapa tahapan, yaitu :

a. Menghambat sintesis dinding sel

Antibakteri ini merusak lapisan peptidoglikogen yang menyusun dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif.

b. Merusak membran plasma

Membran plasma bersifat *semipermeable* dan mengendalikan transport berbagai metabolit ke dalam dan ke luar sel. Adanya gangguan atau kerusakan struktur pada membran plasma dapat menghambat atau merusak kemampuan membran plasma sebagai penghalang (*barrier*) osmosis dan mengganggu sejumlah proses biosintesis yang diperlukan dalam membran.

c. Menghambat sintesis protein

Mekanisme penghambatannya adalah pada sintesis protein, berikatan pada subunit 30S ribosom bakteri (beberapa terikat juga pada subunit 50S ribosom) dan menghambat translokasi peptidil-tRNA dari situs A ke situs P, dan menyebabkan kesalahan pembacaan mRNA dan mengakibatkan bakteri tidak mampu menyintesis protein vital untuk pertumbuhannya.

d. Menghambat sintesis asam nukleat (DNA/RNA)

Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat berupa penghambatan terhadap transkripsi dan replikasi mikroorganisme.

e. Menghambat sintesis metabolit esensial

Penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial antara lain dengan adanya kompetitor berupa anti metabolit, yaitu substansi yang secara kompetitif menghambat metabolit mikroorganisme, karena memiliki struktur yang mirip dengan substrat normal bagi enzim metabolisme.

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-Desember 2017 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, kompor gas, neraca digital, *autoclave* (model S-90N), *laminar air flow* (CURMA model 9005-FL), inkubator, vortex, pipet mikro, pembakar spritus, sentrifuga, tabung sentrifuga, spektrofotometri *UV Vis* Cary Win *UV* 32, mikroskop, kaca preparat, kasa, kapas, rak tabung, jarum ose, tabung durham dan *colony counter*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sawi asin, garam fisiologis (NaCl) 0,85%, media *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) Agar dan Broth (Merck), aquades, medium akridin oranye, natrium hidroksida (NaOH) 1M, buffer fosfat 0,1 M pH 6, pewarna Gram (Gram A, Gram B, Gram C dan Gram D) dan H₂O₂,

C. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

A. Persiapan Alat

Seluruh alat gelas yang digunakan dicuci, dikeringkan dan disterilisasi beserta dengan larutan garam fisiologis (NaCl) 0,85% atau air salin menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121° C dan tekanan 1 atm. Sterilisasi ini bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang tidak diinginkan.

B. Pembuatan Medium Serapan Agar

Pembuatan medium ini digunakan untuk uji antibiotik dengan menggunakan medium akridin oranye kemudian diletakan di cawan petri hingga mengeras dan menyiapkan juga akridin oranye untuk agar pelapis (Meevootisom *et al.*, 1983).

2. Isolasi BAL dari Sawi Asin Terfermentasi

Prosedur awal untuk tahapan isolasi adalah pengenceran. Sebanyak 1ml sampel berupa air rendaman sawi asin terfermentasi diambil dengan menggunakan pipet, kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl) steril sehingga diperoleh pengenceran 10^1 kemudian dikocok hingga homogen, selanjutnya dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 9 ml larutan garam fisiologis (0,85%) steril sehingga diperoleh pengenceran 10^2 . Demikian seterusnya dengan cara yang sama untuk mendapatkan pengenceran yang lebih besar. Dari masing-masing pengenceran kemudian diambil sebanyak 200 μ L dan disebar dengan *Spread Plate Method* pada medium padat, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah 48 jam

dilanjutkan dengan pemilihan koloni tunggal dengan menggunakan metode *Streak Plate* (Jutono *et al.*, 1980).

3. Skrining BAL dari Sawi Asin Fermentasi

Pemurnian isolat dilakukan dengan metode cawan gores atau *Strake Plate method*. Hasil pemurnian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tahap pemurnian dilakukan sekitar 3-4 kali untuk memperoleh isolat murni (koloni tunggal). Koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian ditanam pada media MRS agar miring pada suhu 4°C-10°C hingga siap digunakan untuk pengamatan, sekaligus sebagai stok untuk pengulangan pengamatan.

4. Produksi Riboflavin dari Isolat

Skrining atau penapisan isolat BAL yang mampu memproduksi riboflavin dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media MRS Broth pada erlenmeyer. *Starter* sebanyak 2 loop ose diinokulasi ke dalam 20 ml media MRS Broth dan diinkubasi 48 jam. Setelah diinkubasi untuk memisahkan sel dan supernatan, supernatan hasil sentrifugasi, digunakan pada analisis riboflavin dengan spektrofotometer berdasarkan Sauer *et al.* (1996). Kontrol berupa MRS Broth tanpa penambahan inokulum (isolat BAL) digunakan untuk mengetahui kandungan riboflavin yang terdapat pada media.

5. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Sebanyak 2 ose isolat murni keratin diinokulasikan ke dalam medium *starter* berupa media MRS *broth*, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan *shaker incubator* berkecepatan 150 rpm. Selanjutnya 2% dari medium *starter* ditransfer ke medium kultur dan diinkubasi lagi selama 72 jam dengan interval waktu sampling setiap

12 jam. Hal ini dilakukan untuk pengukuran pertumbuhan mikroba yang dikenal dengan pengukuran OD (*Optical Density*). Pengukuran OD (*Optical Density*) dilakukan dengan cara sebanyak 0,3 ml kultur diencerkan dengan menambah 2,7 ml akuades steril lalu dihomogenkan, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur serapannya menggunakan *spektrofotometer UV-VIS* pada panjang gelombang 600 nm. Blanko digunakan medium MRS *broth* berupa medium cair tanpa isolat lalu ditambahkan 2,7 ml akuades steril. Pengambilan sampel dilakukan secara berkala selama beberapa hari (Anitha *et al.*, 2012).

6. Analisis Konsentrasi Riboflavin dari Isolat BAL Terpilih

Kemampuan memproduksi riboflavin dari isolat, diestimasi berdasarkan Sauer *et al.* (1996) yaitu dengan mencampurkan 0,8 ml kultur cair dengan 0,2 ml NaOH 1M. Sebanyak 0,8 ml dari campuran tersebut kemudian dinetralisasikan dengan 2 ml larutan buffer fosfat 0,1 M pH 6 yang selanjutnya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 448 nm. Menggunakan larutan standar riboflavin, kadar yang diperoleh berdasarkan hasil analisis kemudian dibandingkan dengan kadar pada larutan standar riboflavin yang digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat yang diperoleh dalam menghasilkan riboflavin.

7. Karakterisasi Isolat Bakteri asam laktat

Hasil dari pengukuran kadar riboflavin dengan metode Sauer *et al.* (1996) pada isolat, isolat BAL yang menghasilkan riboflavin tertinggi dipilih sebagai isolat BAL terpilih. Isolat BAL terpilih dikarakterisasi berdasarkan karakteristik fenotip yang meliputi uji morfologi yang terdiri dari pewarnaan Gram dan uji motilitas,

serta kemampuan isolat dalam menghasilkan sifat anti mikroba dengan uji antibakteri (Holt *et al.*, 1994).

A. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui bentuk dan struktur dinding sel dari bakteri. Secara aseptis, 1 ose bakteri di letakkan pada kaca preparat yang telah dibersihkan dengan alkohol, diratakan hingga membentuk lapisan tipis. Setelah kering, difiksasi dengan melewati kaca preparat di atas nyala api spiritus yang bertujuan sebagai proses kerja steril, kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet, setelah itu dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetaskan larutan iodin, setelah beberapa saat dibilas kembali menggunakan air mengalir, dicuci lagi menggunakan alkohol. Setelah kering, ditambahkan beberapa tetes larutan safranin sebagai larutan pembanding, dan didiamkan selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali.

B. Uji Motilitas

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diambil dari stok kultur kemudian ditusukkan ke dalam media SIM (*Sulfat indol Motility*) semi padat pada tabung reaksi menggunakan jarum ose tusuk steril. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri menyebar (motil) dan uji negatif ditandai dengan pertumbuhan bakteri tidak menyebar dan hanya berupa garis (non motil) (Sudarsono, 2008).

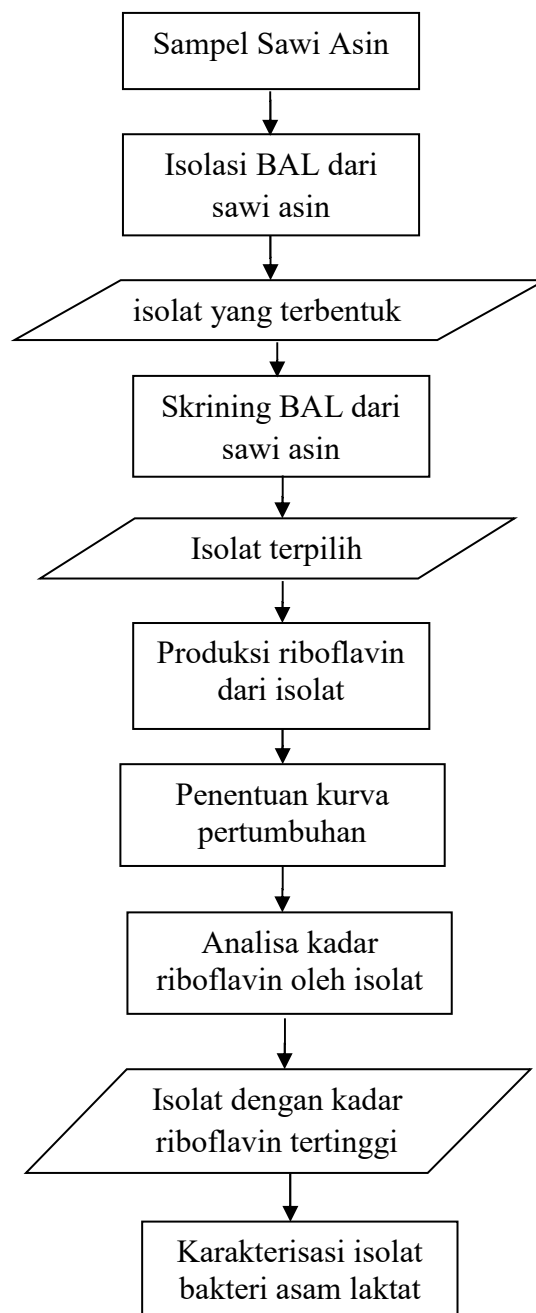
C. Uji Aktivitas Antibiotik

Pengujian aktivitas antibiotik dilakukan secara mikrobiologis dengan metode serapan agar (Meevootisom *et al.*, 1983) menggunakan bakteri uji *E. coli sp* dan *Bacillus Subtilis*. Cawan petri yang berisi medium agar padat kemudian diisi dengan lima *paper disc* steril, lalu pada *paper disc* tersebut ditotolkan sebanyak 10 μ L mikroba hasil isolasi. Biarkan selama tiga jam agar cairan fermentasinya meresap benar ke dalam medium agar. Pekerjaan ini dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*. Selanjutnya, cawan petri ditutup dan diinkubasi pada suhu 37^oC selama 24 jam.

Kemudian, biakan dalam cawan petri tersebut dilapisi dengan campuran homogen dari 7 mL medium agar pelapis dan 1 mL biakan fase pertumbuhan *E. coli* serta *B. subtilis*, dan biarkan selama satu jam agar medium pelapis tersebut memadat. Setelah itu, biakan dalam cawan patri tersebut ditutup dan diinkubasi kembali di dalam inkubator pada suhu 25^oC selama 24 jam (Setyaningsih, 2013). Terbentuknya zona bening di sekitar totolan diamati dan diukur diameter nya dengan menggunakan penggaris. Berdasarkan data zona bening yang diperoleh lalu dilakukan perhitungan indeks hambat antibiotiknya. Rumus indeks hambat antibiotik yaitu a/b , dimana a adalah diameter zona bening dan b adalah koloni.

D. Diagram Alir

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 6.



Gambar 6. Tahapan Penelitian

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Skrining Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) penghasil riboflavin dilakukan menggunakan medium pertumbuhan spesifik bakteri asam laktat berupa media *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) Agar dan Broth (Merck) dengan harapan bakteri asam laktat dapat tumbuh dan berkembang dengan memanfaatkan komponen-komponen yang terdapat dalam komposisi media MRS (Meng *et al.*, 2012).

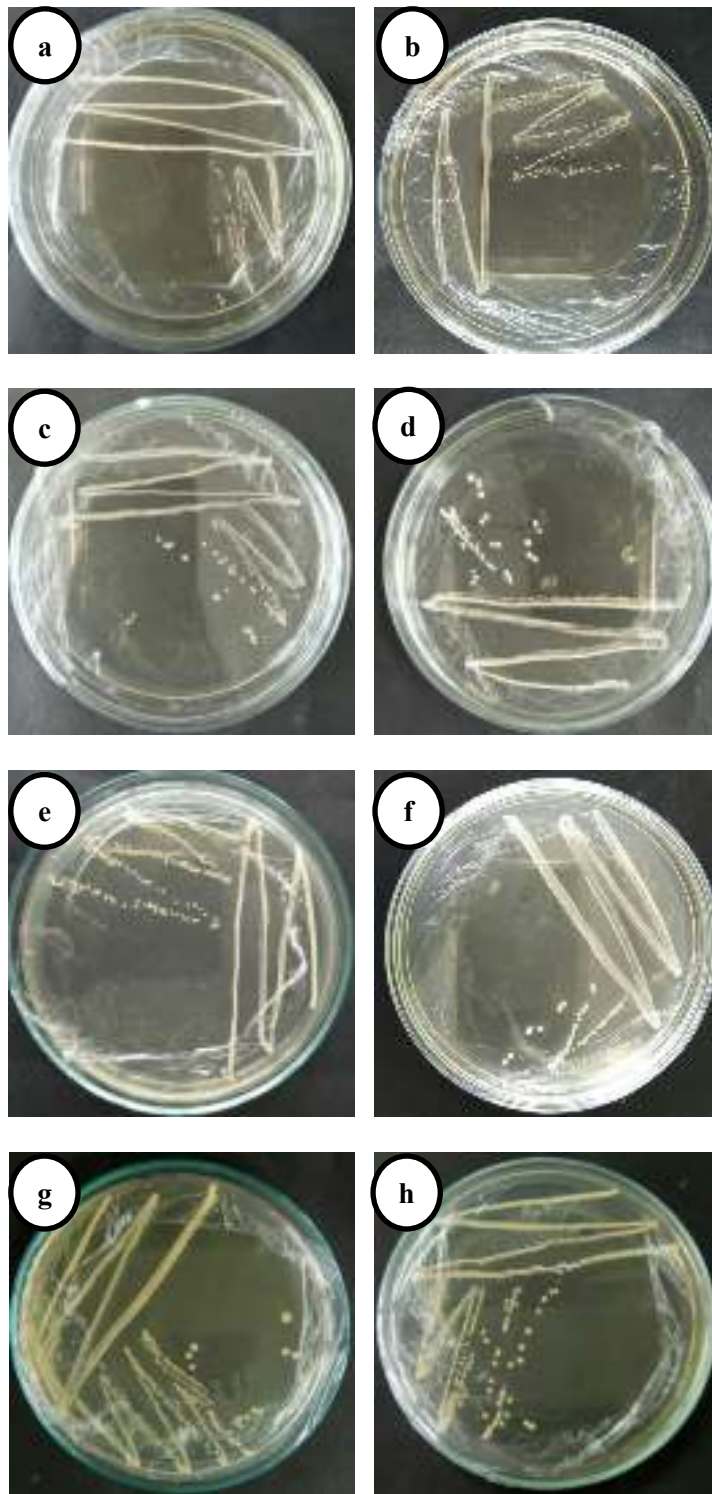
Proses isolasi dilakukan menggunakan sampel berupa fermentasi sawi asin yang dijual di pasar swalayan yaitu di Chandra dan Glael. Isolasi mikroorganisme yang berupa bakteri asam laktat penghasil riboflavin dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Isolasi ini dilakukan dengan teknik pengenceran sampel secara bertingkat. Sebanyak 1 ml sampel berupa air rendaman dari fermentasi sawi asin dicampurkan dalam larutan salin 10 mL kemudian suspensi ini diencerkan sampai sepuluh kali pengenceran, namun hanya pengenceran $10^6 - 10^{10}$ yang dipergunakan. Hal ini dilakukan karena pada pengenceran yang lebih rendah kerapatan pertumbuhan koloni bakteri terlalu tinggi. Masing-masing pengenceran selanjutnya diambil sebanyak 200 μ L dan ditanam pada medium padat menggunakan *Spread Plate*

Method. Data hasil isolasi terdapat pada Tabel 3, sedangkan gambar hasil isolasi bakteri asam laktat dengan metode *spread plate* dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel 3. Data hasil isolasi bakteri asam laktat dari sawi asin terfermentasi

Waktu Isolasi	Tingkat pengenceran terpilih	Isolat tunggal terpilih
Isolasi pertama	Tidak ada	Tidak ada
Isolasi kedua	10^9 dan 10^{10}	2 isolat
Isolasi ketiga	10^9 dan 10^{10}	3 isolat
Isolasi keempat	Tidak ada	Tidak ada
Isolasi kelima	10^7 dan 10^8	3 isolat
Isolasi keenam	Tidak ada	Tidak ada

Hasil isolasi menunjukkan beberapa bakteri asam laktat dari sampel mampu tumbuh pada medium MRS padat sehingga membentuk beberapa koloni bakteri. Terhadap koloni-koloni yang terbentuk pada medium isolasi dipilih berdasarkan tingkat pertumbuhan dan perbedaan warna serta bentuknya untuk selanjutnya dimurnikan melalui proses skrining atau proses penapisan menggunakan metode *Streak Plate* (Gambar 7). Proses ini diulangi sebanyak 3-4 kali sehingga diperoleh isolat tunggal murni. Dari hasil skrining melalui metode *Streak Plate* ini diperoleh delapan isolat bakteri asam laktat yang diperkirakan mampu menghasilkan riboflavin. Isolat tunggal yang tumbuh kemudian disimpan pada medium agar miring sebagai stok. Sebanyak delapan isolat pada medium agar miring ditampilkan pada Gambar 8.



Gambar 7. Skrining metode *Streak Plate* (a) S-2-1 (b) S-2-3 (c) S-3-1 (d) S-3-2 (e) S-3-3 (f) S-5-1 (g) S-5-2 (h) S-5-3.



Gambar 8. Delapan isolat bakteri asam laktat terpilih.

B. Analisis Konsentrasi Riboflavin dari Isolat Terpilih

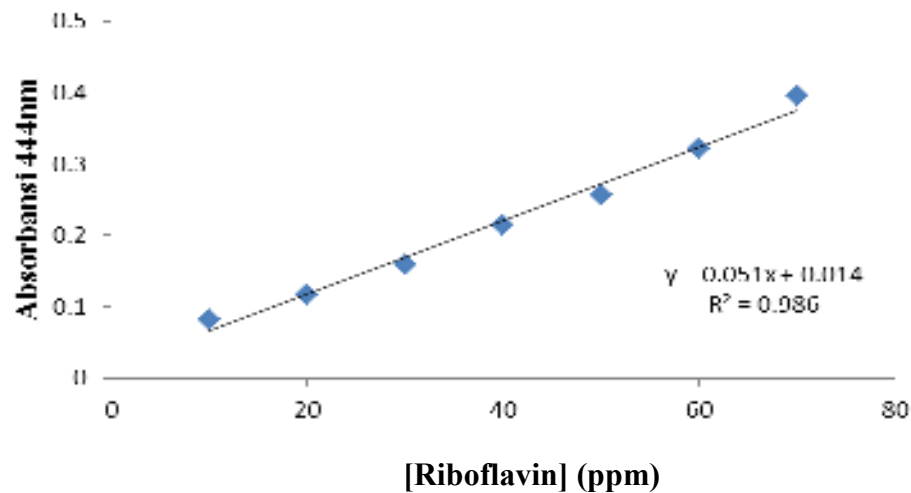
Analisis konsentrasi riboflavin dari isolat bakteri asam laktat terpilih dilakukan untuk mengetahui seberapa besar konsentrasi riboflavin yang mampu dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang diperoleh dari proses skrining. Pengukuran konsentrasi riboflavin dilakukan berdasarkan metode Sauer (Sauer *et al.*, 1996) yang selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 444 nm.

Tahap pertama untuk mengetahui konsentrasi riboflavin dalam sampel adalah dengan pembuatan kurva kalibrasi yaitu kurva standar riboflavin. Kurva kalibrasi ini merupakan grafik yang menyatakan hubungan kadar larutan baku dengan hasil pembacaan absorbansi larutan yang biasanya berupa garis lurus. Kurva kalibrasi standar riboflavin diukur dari larutan standar riboflavin yang telah diketahui konsentrasinya. Fungsi dari larutan standar ini adalah sebagai standar dalam pengukuran analit yang nantinya hasilnya akan diplotkan pada kurva standar untuk menentukan persamaan regresi linear dari kurva.

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan mengencerkan larutan stok riboflavin 100 ppm dengan menggunakan perhitungan $V_1.M_1=V_2.M_2$. Larutan stok diencerkan secara bertingkat hingga didapatkan larutan riboflavin dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40; 50; 60 dan 70 ppm. Larutan standar ini diperlakukan sebagaimana perlakuan terhadap larutan sampel. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dibuatkan kurva kalibrasi terhadap konsentrasi larutan standar sehingga didapatkan nilai koefisien korelasi (R^2). Nilai absorbansi dari larutan standar dapat dilihat pada Tabel 4. Pada penelitian ini kurva standar yang diperoleh memiliki persamaan regresi linear $y = 0.051x + 0.014$ dengan koefisien korelasi (R^2) 0.986. Kurva kalibrasi Riboflavin dapat dilihat pada Gambar 9. Perhitungan penentuan konsentrasi larutan standar riboflavin dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 4. Nilai absorbansi larutan standar riboflavin

X	Y
10	0,082
20	0,117
30	0,159
40	0,214
50	0,256
60	0,321
70	0,395



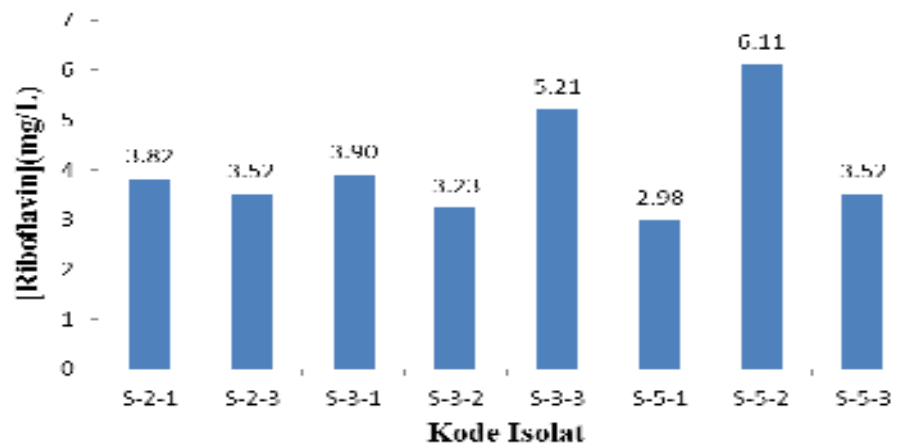
Gambar 9. Kurva standar Riboflavin

Selanjutnya, dilakukan proses yang sama terhadap delapan isolat terpilih untuk mengetahui konsentrasi riboflavin yang mampu dihasilkan oleh delapan isolat terpilih. Medium cair pada penelitian ini menggunakan medium MRS Broth yaitu berupa medium yang seperti pada medium isolasi dan skrining hanya saja tidak menggunakan agar. Sebanyak delapan isolat terpilih masing-masing diinokulasikan dalam medium cair MRS Broth selama 48 jam. Setelah 48 jam riboflavin diisolasi dengan metode sentrifugasi kultur, sehingga diperoleh filtrat yang mengandung riboflavin. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing isolat kemudian dianalisis kadar riboflavinnnya berdasarkan metode Sauer *et al* (1996) yaitu dengan cara menambahkan 0,8 ml filtrat dari masing-masing isolat dengan 0,2 ml larutan NaOH 1 M, hal ini dilakukan agar riboflavin pada kultur bakteri dapat menghasilkan senyawa berflouresen. Sebanyak 0,8 ml dari campuran tersebut ditambahkan dengan 2 ml buffer fostat 0,1 M pH 6 yang dilakukan guna mempertahankan pH campuran pada pH 6, untuk selanjutnya diuji menggunakan

spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 444 nm (Sauer *et al.*, 1996).

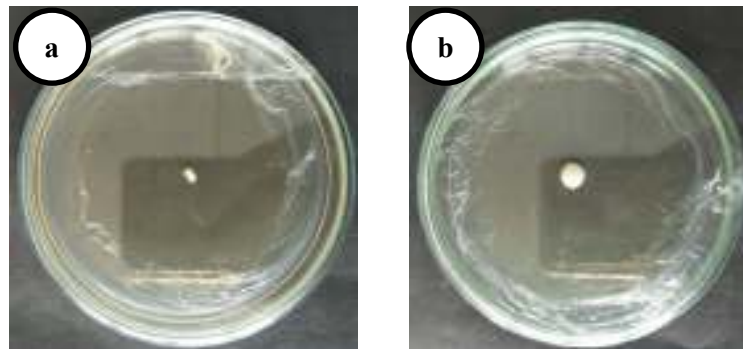
Konsentrasi riboflavin dari delapan isolat terpilih dapat dilihat pada Gambar 10.

Perhitungan konsentrasi riboflavin dari delapan isolat dapat dilihat pada Lampiran 3.



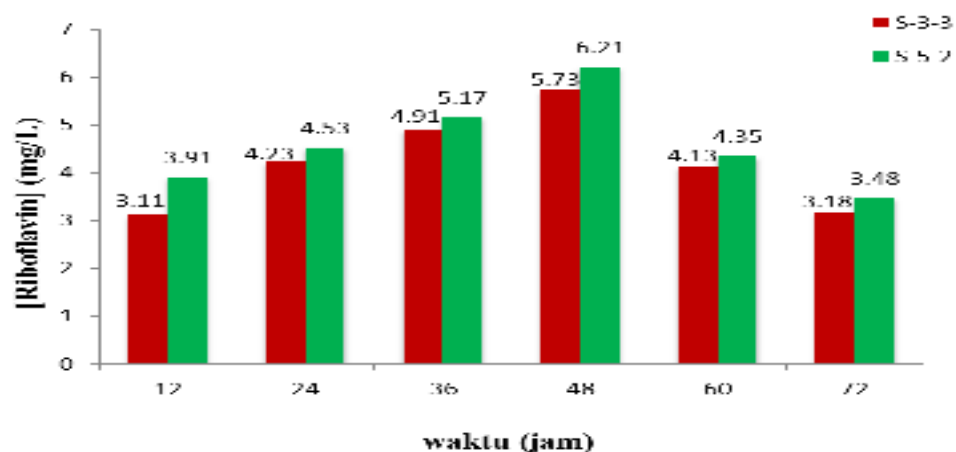
Gambar 10. Konsentrasi Riboflavin dari delapan isolat terpilih

Secara umum kedelapan isolat S-2-1, S-2-3, S-3-1, S-3-2, S-3-3, S-5-1, S-5-2, dan S-5-3 mampu menghasilkan riboflavin. Isolat S-3-3 dan isolat S-5-2 memiliki konsentrasi lebih tinggi dari pada yang lainnya yaitu sebesar 5,21 mg/L dan 6,11 mg/L. Kadar riboflavin yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat dari sawi asin lebih besar dibandingkan dengan kadar riboflavin yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* NZ9000 yang menghasilkan riboflavin sebanyak 1,2 mg/L (Sybesma *et al.*, 2003). Kadar riboflavin yang dihasilkan S-3-3 dan S-5-2 lebih besar dibandingkan dengan kadar riboflavin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus fermentum* MTCC 8771 hasil isolasi dari susu fermentasi di daerah Katpadi yang menghasilkan riboflavin sebanyak 2,29 mg/L (Jayashree *et al.*, 2010). Profil visual isolat S-3-3 dan S-5-2 dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Dua isolat setelah 72 jam inkubasi (a) Isolat S-3-3 (b) Isolat S-5-2.

Terhadap kedua isolat dengan konsentrasi riboflavin, selanjutnya dilakukan pengujian kadar riboflavin dengan waktu inkubasi selama 72 jam dengan interval waktu sampling setiap 12 jam sekali untuk mengetahui konsistensi serta waktu optimum diperolehnya riboflavin yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut. Profil perubahan konsentrasi riboflavin dengan waktu inkubasi 72 jam dapat dilihat pada Gambar 12. Data konsentrasi riboflavin pada isolat S-3-3 dan S-5-2 dengan waktu inkubasi 72 jam dapat dilihat pada Lampiran 4.

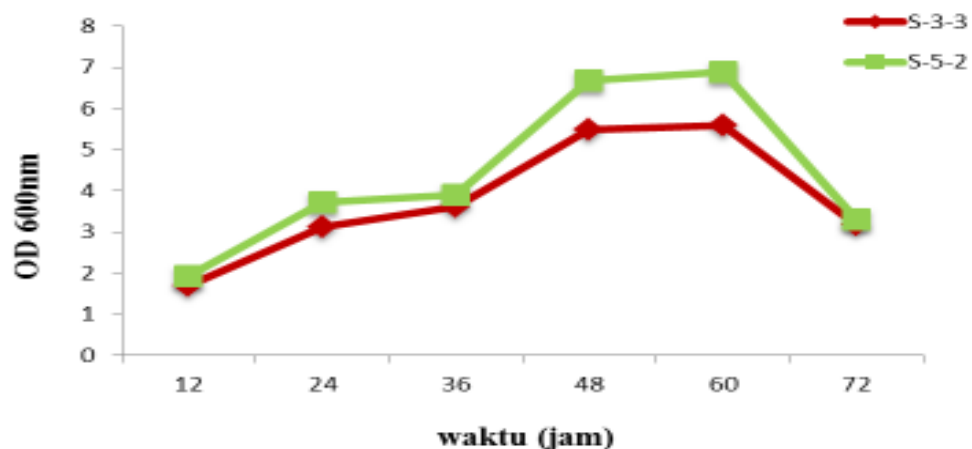


Gambar 12. Diagram perubahan konsentrasi riboflavin pada isolat S-3-3 dan S-5-2 dengan waktu inkubasi 72 jam.

Berdasarkan diagram perubahan konsentrasi riboflavin pada isolat S-3-3 dan S-5-2 untuk waktu inkubasi 72 jam dengan interval waktu sampling setiap 12 jam sekali menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi tetap berada pada waktu inkubasi 48 jam dan telah mengalami penurunan pada waktu inkubasi 60 jam, sehingga dapat disimpulkan bahwa waktu optimum isolat menghasilkan konsentrasi riboflavin tertinggi terjadi pada waktu 48 jam.

C. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin

Isolat terpilih yaitu isolat S-3-3 dan S-5-2 dikultur pada medium cair, kemudian diinkubasi selama 72 jam dengan waktu sampling 12 jam. diperoleh kurva pertumbuhan dari isolat S-3-3 dan S-5-2 terhadap waktu inkubasi seperti pada Gambar 13. Data pertumbuhan jumlah sel pada isolat S-3-3 dan S-5-2 dengan waktu inkubasi 72 jam dapat dilihat pada Lampiran 5.

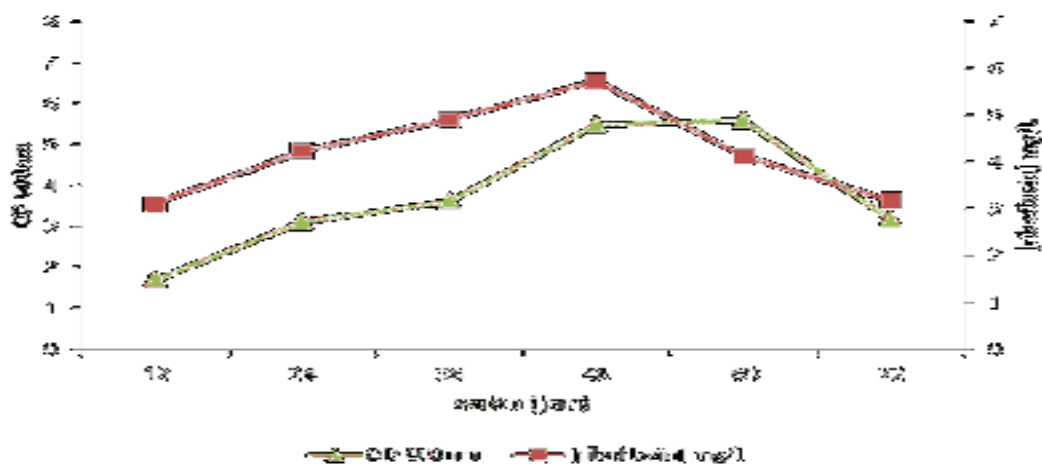


Gambar 13. Kurva pertumbuhan sel isolat S-3-3 dan S-5-2 72 jam pada λ 600 nm.

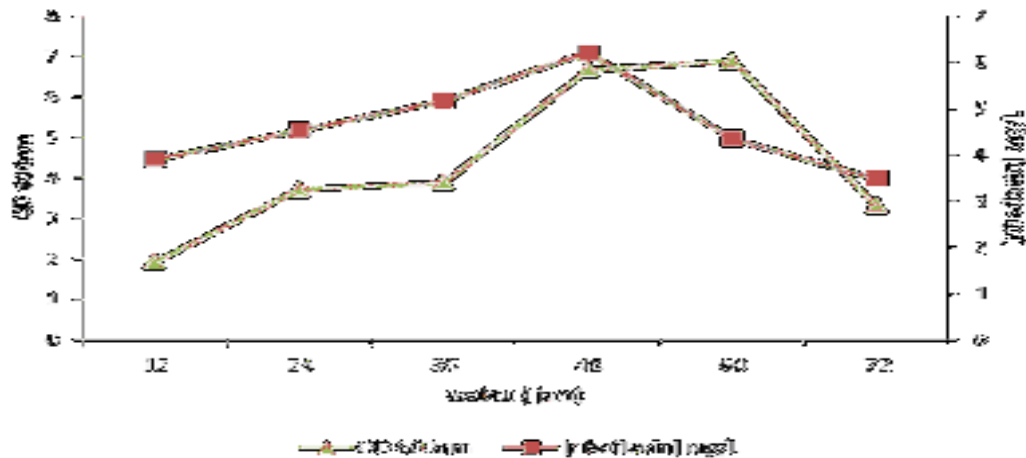
Berdasarkan pola grafik yang dihasilkan kedua isolat, pada inkubasi selama 72 jam profil 4 fase pertumbuhan telah tercapai pada jam ke 48 untuk kedua isolat S-3-3 dan

S-5-2. Fase adaptasi berlangsung antara jam pertama hingga jam ke 36. Fase pertumbuhan tercapai pada jam ke 48. Fase stasioner tercapai antara jam ke 48 sampai jam ke 60, sedangkan fase kematian tercapai setelah jam ke 72 untuk kedua isolat.

Setelah diperoleh kurva perubahan konsentrasi riboflavin dan kurva pertumbuhan sel isolat pada kedua isolat yang dilakukan pada waktu inkubasi 72 jam maka dapat diperoleh gabungan kurva dari kurva perubahan konsentrasi riboflavin dan kurva pertumbuhan sel isolat yang digunakan untuk membandingkan waktu optimum isolat menghasilkan konsentrasi riboflavin terbaik dan waktu pertumbuhan optimum sel isolat S-3-3 dan S-5-2 sehingga dapat menghasilkan secara optimum konsentrasi riboflavin dan pertumbuhan selnya yang dapat dilihat pada Gambar 14 dan Gambar 15. Data hubungan konsentrasi riboflavin dan jumlah sel isolat S-3-3 dan S-5-2 dapat dilihat pada Lampiran 6.



Gambar 14. Kurva hubungan antara konsentrasi riboflavin dan jumlah sel dengan waktu inkubasi 72 jam isolat S-3-3.



Gambar 15. Kurva hubungan antara konsentrasi riboflavin dan jumlah sel dengan waktu inkubasi 72 jam isolat S-5-2.

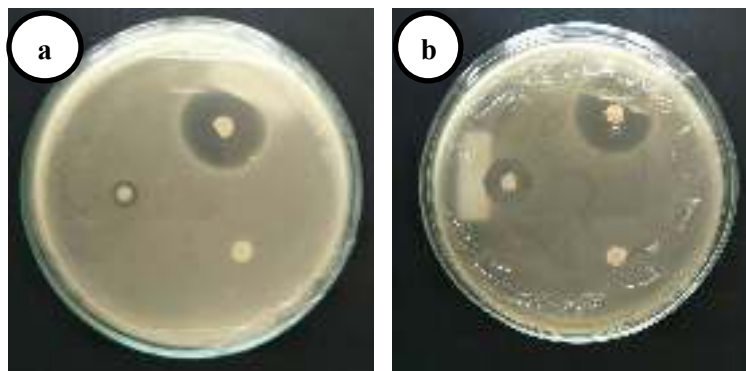
D. Uji Antimikroba

Metode *disc diffusion* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba permukaan media agar (Batrowne and Szenthe, 1989). Bakteri patogen yang digunakan pada uji anti mikroba kali ini adalah *E. coli*. Uji aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen yang dilakukan meliputi kultur bakteri asam laktat dan supernatan netralnya. Kultur bakteri asam laktat yang memberikan zona bening adalah kultur yang memiliki daya antimikroba terhadap bakteri uji. Zona penghambatan diukur dari pinggiran sumuran sampai lingkaran terluar zona bening. Pada Gambar 16 dapat dilihat tiga buah cakram disk yang berisi kontrol positif berupa senyawa *Chloramphenicol* (zona bening terlihat besar), isolat S-3-3 dan S-5-2 sebagai sampel uji (zona bening terlihat lebih kecil) dan kultur tanpa penambahan isolat

sebagai kontrol negatif (zona bening tidak terbentuk). Hasil pengujian aktivitas penghambatan kultur bakteri asam laktat pada isolat S-3-3 dan S-5-2, tampak bahwa kultur bakteri asam laktat yang diuji secara keseluruhannya dapat menghambat bakteri patogen, daya hambatnya bervariasi yang ditunjukkan dengan besar kecilnya zona bening.

Dilihat dari besarnya zona penghambatan terhadap bakteri patogen *E. coli*, S-5-2 memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat dengan zona penghambatan 2.6 sedangkan untuk S-3-3 juga memberikan aktivitas penghambatan namun nilainya lebih kecil yaitu sebesar 1,5. Data perhitungan konsentrasi kontrol positif dan sampel yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 7.

Aktivitas penghambatan dapat terjadi karena akumulasi metabolit primer berupa asam laktat, etanol dan karbondioksida ataupun karena metabolit sekunder berupa senyawa hidrogen peroksida dan bakteriosin. Menurut Rachmawati *et al.*, bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* yang diisolasi dari produk pangan fermentasi dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* dengan membentuk zona bening.



Gambar 16. Uji antimikroba isolat bakteri asam laktat terhadap *E. coli* (a) Isolat S-3-3 (b) Isolat S-5-2.

Hasil penelitian menunjukkan kultur bakteri asam laktat dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*. Penghambatan terhadap bakteri patogen terutama disebabkan oleh komponen metabolit yang dihasilkan saat fermentasi. Aktivitas penghambatan kultur bakteri asam laktat berupa zona bening terjadi karena aktivitas senyawa antimikroba yang bersifat bakterisidal yaitu asam organik. Menurut Ray dan Daeschel (1992) asam organik khususnya asam laktat bersifat bakterisidal pada pH 4,5 dengan konsentrasi di atas 0,2%. Menurut Alokami *et al.* (2000) asam organik yang dihasilkan menyebabkan penurunan pH dan menyebabkan sitoplasma sel menjadi asam, mengacaukan potensial transmembran dan menghambat transport substrat.

Beberapa senyawa antimikroba membutuhkan konsentrasi yang besar supaya aktivitas antimikroba efektif seperti etanol efektif menghambat mikroorganisme lain jika dalam konsentrasi yang besar yaitu 18-22% (Dillon and Cook, 2000). Hidrogen peroksida bersifat bakteriostatik dengan konsentrasi 6-8 mg/mL (Ray and Daeschel, 1992) dan dipengaruhi oleh kondisi aerasi saat pertumbuhan bakteri, kultur bakteri yang diaerasi menghasilkan hidrogen peroksida 2-3 kali lebih banyak dari kultur yang tidak teraerasi (Teyssset *et al.*, 2000). Diasetil hanya bersifat bakterisidal pada konsentrasi yang besar dan efektif pada pH rendah yaitu 5,0 (Dillon and Cook, 2000).

E. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin

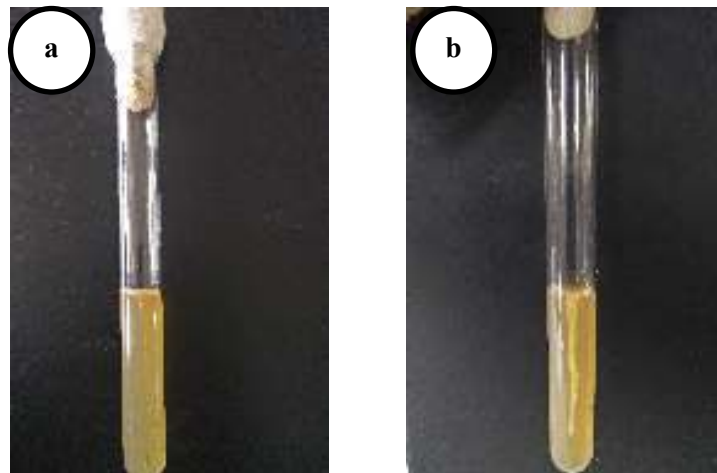
Kedua isolat yang diperoleh yaitu S-3-3 dan S-5-2 selanjutnya dikarakterisasi morfologi dan struktur dinding sel dengan pewarnaan Gram dan uji motilitas.

Pewarnaan Gram berfungsi untuk mengetahui struktur dinding sel bakteri sedangkan

uji motilitas berfungsi mengetahui keberadaan flagel pada bakteri (Jawetz *et al.*, 2005).

Dari hasil uji motilitas, isolat S-3-3 dan S-5-2 bersifat non motil atau tidak bergerak. Pergerakan sel diamati secara visual dengan cara menginokulasi pada media tegak semi solid. Menurut Fardiaz (1992), bakteri asam laktat memiliki sifat tidak bergerak. Uji motilitas isolat S-3-3 dan S-5-2 dapat dilihat pada Gambar 17.

Berdasarkan mekanisme gerak bakteri bila dilihat dari ada tidaknya alat gerak dapat digolongkan dalam bakteri yang bersifat motil dan yang bersifat non motil. Bakteri yang bersifat motil memiliki alat gerak yang dinamakan flagel, alat gerak ini sangat halus ($20\mu\text{m}$) sehingga tidak dapat dilihat dengan mikroskop. Pergerakan flagel bakteri adalah dengan cara memutar flagel berbentuk helix. Pergerakan ini dapat disamakan dengan alat pembuka botol gabus, dan untuk bakteri yang tidak memiliki alat gerak umumnya bergerak secara mengelinding meluncur dan akan bergerak apabila ada kontak terhadap benda padat (Darkuni, 2001). Flagela merupakan struktur kompleks yang tersusun atas bermacam-macam protein termasuk flagelin yang membuat flagela berbentuk seperti tabung cambuk dan protein kompleks yang memanjangkan dinding sel dan membran sel untuk membentuk motor yang menyebabkan flagela berotasi. Flagela berbentuk seperti cambuk. Flagela digunakan bakteri sebagai alat gerak.

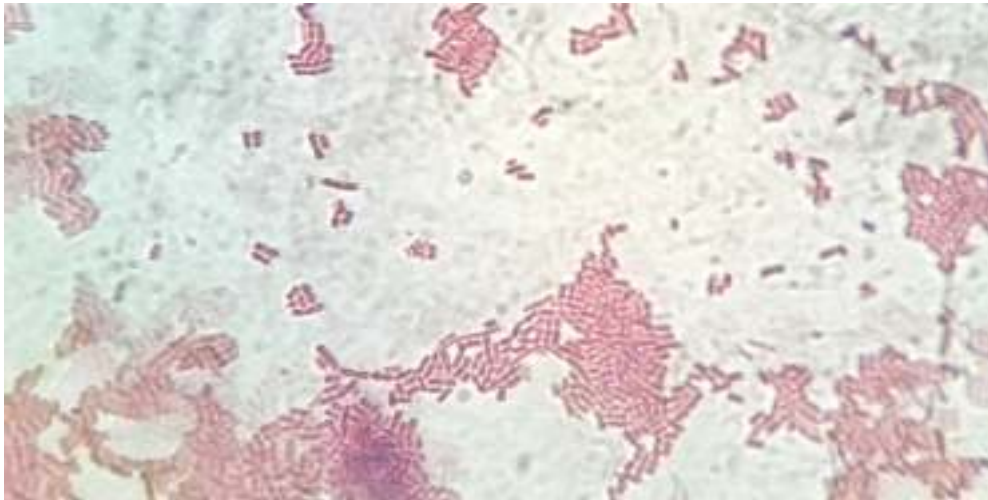


Gambar 17. Uji motilitas isolat bakteri asam laktat (a) Isolat S-3-3 (b) Isolat S-5-2.

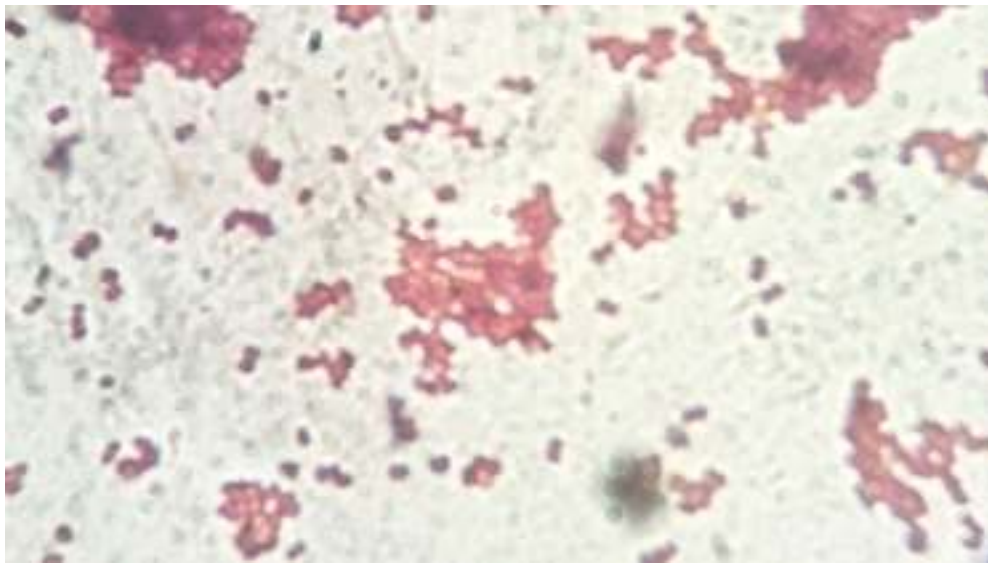
Tidak semua bakteri mempunyai daya motilitas, ada bakteri yang tidak mempunyai alat gerak yaitu flagel sehingga berdasarkan letak dan jumlah flagel pada sel bakteri, jenis ini digolongkan dalam bakteri atrik (Dwidjoseputro, 1978). Berdasarkan hasil analisis data dapat diketahui bahwa bakteri tidak bergerak dengan kekuatan sendiri melainkan bergerak maju kemudian mundur ke tempat semula. Bakteri tidak menunjukkan gerakan yang cepat dan perpindahan tempat saat diamati. Oleh karena itu dapat dipastikan bahwa gerakan yang terjadi adalah gerak *Brown* (gerakan yang terjadi pada bakteri akibat adanya energi kinetik). Pada gerak *Brown*, semua organisme bergetar dengan laju yang sama dan menjaga hubungan ruang yang tetap satu sama lain, sedangkan bakteri yang motil terus menerus bergerak ke arah tertentu (Wesley and Wheeler, 1988).

Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, didapatkan hasil yaitu semua isolat S-3-3 dan S-5-2 memiliki karakter Gram positif. Menurut Wibowo (1988), bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif karena tidak mengalami dekolorisasi dan tetap

mengikat warna ungu kristal violet pada tahap akhir pewarnaan dan tidak dapat dilunturkan oleh alkohol. Hal ini berkaitan dengan stuktur dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel dengan komposisi peptidoglikan yang tebal dan lipid yang tipis. Hasil pewarnaan Gram bakteri dapat dilihat pada Gambar 18 dan Gambar 19.



Gambar 18. Hasil pewarnaan gram isolat S-3-3



Gambar 19. Hasil pewarnaan gram isolat S-5-2

Dari hasil pewarnaan gram dapat diamati pula bentuk sel bakteri. Bentuk sel bakteri berdasarkan hasil pengamatan yaitu bentuk batang pada isolat S-3-3 dan bentuk bulat pada isolat S-5-2. Perbedaan bentuk sel pada kedua isolat disebabkan oleh perbedaan jenis bakteri asam laktat dari isolat S-3-3 dan isolat S-5-2. Data hasil keseluruhan karakterisasi isolat S-3-3 dan S-5-2 dapat dilihat pada Lampiran 8.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang didapat dari penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Dari serangkaian proses skrining diperoleh delapan isolat bakteri asam laktat dari sampel air rendaman fermentasi sawi asin dan dinamai dengan nama isolat S-2-1, S-2-3, S-3-1, S-3-2, S-3-3, S-5-1, S-5-2, dan S-5-3.
2. Dari kedelapan isolat bakteri asam laktat secara umum mampu menghasilkan riboflavin, namun pada isolat S-3-3 dan isolat S-5-2 memiliki konsentrasi lebih tinggi dari pada yang lainnya yaitu sebesar 5,21 mg/L dan 6,11 mg/L.
3. Dari kurva pertumbuhan sel yang diperoleh, pertumbuhan tertinggi terjadi pada waktu inkubasi 48 jam untuk kedua isolat bakteri asam laktat terpilih.
4. Kedua isolat terpilih yaitu S-3-3 dan S-5-2 memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen yaitu bakteri *E. coli*. Pada S-5-2 memiliki daya hambat yang lebih besar yaitu sebesar 2,6 sedangkan pada S-3-3 memiliki daya hambat sebesar 1,5.
5. Kedua isolat bakteri terpilih merupakan Gram positif dan bersifat non motil. Pada isolat S-3-3 berbentuk batang dan pada isolat S-5-2 berbentuk bulat.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka untuk penelitian selanjutnya disarankan sebagai berikut :

1. Perlunya dilakukan karakterisasi berdasarkan karakteristik fenotipnya.
Karakterisasi fenotip meliputi uji pertumbuhan isolat pada pH, suhu, dan salinitas yang berbeda, serta pengamatan terhadap tipe fermentasi isolat.
Karakteristik fenotip juga dapat dilakukan untuk mengetahui jenis dari isolat yang diamati.
2. Perlunya dilakukan isolasi bakteri asam laktat penghasil riboflavin dari sumber isolat berupa produk pangan fermentasi lainnya juga untuk membandingkan konsentrasi riboflavin yang dihasilkan dari sumber isolat yang berupa fermentasi sawi asin dibandingkan sumber isolat lainnya.
3. Perlunya dilakukan uji antimikroba dengan berbagai variasi konsentrasi agar lebih diketahui secara spesifik kemampuan isolat bakteri asam laktat dalam menghasilkan daya hambat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Z. 2011. *Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus Niger Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*. Jurnal. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. UNDIP. Semarang.
- Akhilender. 2003. *Dasar-Dasar Biokimia I*. Erlangga, Jakarta
- Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandhol, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. 2000. *Lactic Acid Permeabilizes Gram Negative Bacteria by Disrupting The Outer Membrane*. Applied and Environmental Microbiology 66(5):2001-2005.
- Andarwulan, N. 1990. *Kimia Vitamin*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Axelsson, L. 2004. *Lactic acid bacteria: Classification and Physiology*. di dalam Salminen, S. and Von Wright A. (Eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc. New York
- Batrowne, L.M. and Szenthe, N.A., 1989, *Laboratory Manual for Mikrobiology*. Department of Chemistry. University of Alberta. Canada.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publishing Company. California.
- Chaplin, M.F. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. England.
- Damerco, J. L. 2003. "Production Of Hydrolytic Enzyme By *Trichoderma* Isolation With Antagonistic Activity Against *Crinipellis Perniciosathe Causal Agent Of Witches' Broom Of Cocoa*," Brazilian J. of Micro. 34, pp. 33-38.

- Darkuni, M. N. 2001, *Mikrobiologi (Bakteriologi, Virologi, dan Mikologi)*, Universitas Negeri Malang, Malang
- Departemen Kesehatan. 2010. Menkes Resmikan RS Mata Cicendo Sebagai Pusat Mata Nasional.
<http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1063>. March 23th, 2012.
- Dillon, V.M. and Cook, P.E. 2000. *Biocontrol of Undesirable Microorganisms in Food*. In: Dillon, V.M. and R.E. Board (eds). *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. Wallingford: CAB International.
- Dorland, W.A. and Newman. 2006. *Kamus Kedokteran edisi 31*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. 1978. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Fan, L.T., Lee, Y.H., and Gharpuray, M. 1982. *The nature of lignocellulosics and their pretreatment for enzymatic hydrolysis*. *Advances in Biochem. Eng.* 23: 158-187.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi pengolahan pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar-Universitas Pangan dan Gizi, IPB Bogor.
- Fowler, M. W. 1988. "Enzyme Technology" in *Biotechnology For Engineers, Biological System in Technological Processes*, Edited : Scragg, A. H., John Wiley & Sons. New York.
- Gaman, P. M and Sherrington, K. B. 1994. *Ilmu pangan , pengantar ilmu pangan, nutrisi dan mikrobiologi*. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Gandjar, I., Sjamsuridzal. W. dan Oetari, A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Ganiswara, S. G, Setiabudy dan Suyatna, F. D. 1995. *Farmakologi dan Terapi edisi 4*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Grisham and Reginald H. Garrett. 1999. *Biochemistry*. Saunders College Pub. Philadelphia.

- Gokhan, C. 2002. *Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of Aspergillus niger Z10 Wild-Type Strain*. Turk J. Biol. 26 (2002) 209-213.
- Gupte, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Guyton, A. C . 2007. *Biokimia untuk Pertanian*. USU-Press. Medan.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Dalam Praktek*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Hidayat, N., Padaga, M. C. dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. ANDI. Yogyakarta
- Holt, J. G., Krieg, N. R, Sneath. P. H. A., Staley. J. T and Williams. S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition*. Williams and Wilkins. United Stated of America.
- Hutkins, R.W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing Professional. United Stated of America.
- Ikram-ul-haq. 2005. *Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of Aspergillus niger and Trichoderma viride*. Res. J. Agric & Biol. Sci. 1(3):241-245.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganismen*. Yrama Widya. Badung.
- Jawetz, M. and Adelberg. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill Companies Inc. New York.
- Jay, J.M. 1992. *Modern Food Microbiology. 4th edition*. Chapman and Hall. New York.
- Jayashree, S. Kunthala, J. and Gurumuthy, K. 2010. *Isolation, Screening, and Characterization of Riboflavin Producing Lactic Acid Bacteria From Katpadi, Vellore District*. Recent Research in Science and Technology 2 (1) : 83-88.
- Kapoor, K. 2010. *Illustrated Dictionary of Microbiology*. Delhi: Oxford Book Company. India.

- Khomsan, A. 2010. *Pangan dan Gizi untuk Kesehatan*. Raja Grafindo Persada, 140-143. Jakarta.
- Kuswanto, K.R. 2004. *The Industry of Fermented Food in Indonesia: Present Status and Development*. di dalam: Proceedings of the International Seminar on Developing Agricultural Technology for Value-added Food Production in Asia. Japan.
- Lay, B. W. and Hastowo. 1982. *Mikrobiologi*. Rajawali Press Jakarta.
- Leblanc, L., Tora, E. V., and Allwood. A. J. 2013. *Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacini) in the Pacific Islands: 2. infestation statistics on economic hosts*. Proceedings of The Hawaiian Entomological Society 45: 83-117.
- Lee, S.M. 2001. *Pilot scale production of cellulose using Trichoderma reesei Rut C-30 in fed-batch mode*. J Micro Biotech 11: 229-233.
- Lehninger, A.L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Martoharsono, S. 1981. *Biokimia*. UGM Press. Yogyakarta.
- Mandels, M., Raymond, A. and Charles, R. 1976. *Measurement of Saccharifying Cellulose*. Biotech. & Bioeng. Symp. 6. John Wiley & Sons Inc.
- Mevootisoom, V, Somsuk, P., Prachaktam and Flegel, T. 1983. *Simpel Screening Methods for Isolation of Penicillin Acylase Producing Bacteria*. Appl Environ Microbial 46.
- Muchtadi, D. 1989. *Petunjuk Laboratorium Evaluasi Nilai Gizi Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Pauling, L. 1971. *General Chemistry edisi 4*. Gaya Baru. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.

- Pratiwi, S.T.2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Yogyakarta.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein D. 2002. *Prescott-Harley-Klein's: Microbiology, 5th ed*. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Rahayu, A. G. 2014. *Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease dari Tiga Isolat Bacillus sp. Galur Lokal Riau. Skripsi*. FMIPA, Universitas Riau, Pekanbaru.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology. 3rd ed*. CRC Press LLC. USA.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York.
- Reddy,G., Altaf, M.D., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Kumar, E.V. 2008. *Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation, A Review*. Biotechnology Advances 26: 22-34
- Reese, E.T. 1976. *History of Cellulase Program at U.S. Army Natick Development Center*. Biotech. & Bioeng. Symp., 6. John Wiley & Sons Inc.
- Ren, J., McFerson, J.R., Li, R., Kresovich, S. and Lamboy, W.F. 1995. *Identities and Relationships among Chinese Vegetable Brassicas as Determined by Random Amplified Polymorphic DNA Markers*. J. AMER. SOC. HORT. SCI. 120(3):548-555.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis : Spektrofotometri UV dan Tampak (visibel)*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Sadek, N.F., Wibowo, M. dan Kusumaningtyas, E. 2009. *Pengaruh Konsentrasi Garam dan Penambahan Sumber Karbohidrat terhadap Mutu Organoleptik Produk Sawi Asin*. IPB. Bogor.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H. P., Manneberg, M., van Loon, A. P. G. M. and Bailey, J. E. 1996. *Physiology and Metabolic Fluxes of Wild Type and Riboflavin Producing Bacillus subtilis*. Appl Environ. Microbiol. 62 : 3687-3696.
- Setyaningsih, D., Anton, A. dan Maya, P.S. 2010. *Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Agro*. IPB Press. Bogor.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung.

- Sherwood, L. 2001. *Biochemistry for Dental Students*. CBS Publishers and Distributor. New Delhi.
- Shimizu, S. 2001 *Vitamins and Related Compounds: Microbial production*. Biotechnology (2nd Edition). MacGraw Hill : New York.
- Steinkraus, K.H. 1985. *Indigenous Fermented-Food Technologies for small-scale industries*. Food and Nutrition Bulletin 7. Japan.
- Smith, A.L. 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. Oxford.
- Stringer, J.L. 2006. *Basic Concepts in Pharmacology*. Mc Graw Hill. New York.
- Sunita, A. (2009) *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sybesma, W., Catherine, B., Marjo, S., Douwe van, S. and Jeroen, H. 2003. *Multivitamin Production in Lactococcus Lactis Using Metabolic Engineering*. Metabolic Engineering (6): 109–115.
- Teyssset, C.M., F. de la Torre and J.R. Garel. 2000. *Increased Production of Hydrogen Peroxide by Lactobacillus Delbrueckii subsp. Bulgaricus upon Aeration: Involvement of on NADH Oxidase in Oxidative Stress*. Journal of Applied Environmental Microbiology 66 (1): 262-267.
- Tjay, T. H. dan Rahardja, K. 2007. *Obat-Obat Penting*. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Usmiati, S. 2012. *Daging Tahan Simpan dengan Bakteriosin*. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian 34(2): 12-14.
- Volk, W.A. and Wheeler, M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*, Jilid 1, Edisi kelima. Alih bahasa oleh Soenarto Adisoemarto, Ph.D. Erlangga. Jakarta
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. UMM PRESS. Malang.
- Williamson, K.L. and Fieser, L.F. 1992. *Organic Experiment 7th Edition .D C* Health and company. United States of America.
- Winarno, F.G. 1989. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia : Protein, Enzim dan asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wuryanti. 2004. *Isolasi dan Penentuan Aktivasi Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (Ananas comosus L.)*. Artikel: JKSA, 7(3) : 83-87.
- Yuniastuti, L. 2008. *Penuntun Praktikum Biokimia*. Laboratorium Terpadu Kesehatan Masyarakat AIPTKMI Regional Indonesia Timur UNHAS, Makassar.