STUDI KEMAMPUAN PROBIOTIK ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA TINGGI ASAL SAWI ASIN *(Brassica juncea)*

Probiotic Assay of Lactic Acid Bacteria as High Exopolysaccharides Producer from Sour Pickled Mustard (Brassica juncea)

Christine Natalia Halim[1]*, Elok Zubaidah[1]

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145
*Penulis Korespondensi, e-mail: xtinenatalie@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan produksi EPS dan kemampuan probiotik isolat BAL hasil isolasi dari fermentasi sawi asin sehingga didapatkan isolat BAL yang memberikan manfaat bagi kesehatan tubuh. Hasil isolasi BAL dari sawi asin *(Brassica juncea)* didapatkan 4 isolat BAL dengan produksi EPS sebesar 1515-1990 mg/L di mana hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan EPS yang dihasilkan oleh BAL probiotik komersial (*L. casei*) sebesar 1340 mg/L yang biasa digunakan dalam industri pangan fermentasi. Dari beberapa pengujian probiotik secara *in-vitro* didapatkan 1 isolat terbaik (K1-1242) dengan ketahanan terhadap pH 2.5 sebesar 43.53%, ketahanan terhadap pH 3.0 sebesar 69.86%, ketahanan terhadap 3% garam Oxgall sebesar 4.22%, diameter zona hambat sebesar 10.14 mm terhadap *E. coli* dan 8.73 mm terhadap *S. aureus*. Observasi via SEM ditemukan sel berbentuk batang dengan filamen EPS yang menghubungkan 2 sel. EPS yang diproduksi oleh BAL sangat potensial untuk pengujian *in-vivo* lebih lanjut dalam meninjau sifat *pharmaceutical*-nya.

Kata Kunci: BAL, Eksopolisakarida, Probiotik, Sawi Asin

ABSTRACT

The research is aimed to determine the ability of EPS production and probiotic assay of LAB from sour pickled mustard. So the LAB isolate will provide health benefits. Four LAB isolates is obtained from sour pickled mustard (Brassica juncea) with EPS of production from 1515 to 1990 mg/L, which the result is higher than the EPS produced by commercial probiotics LAB (L. casei) of 1340 mg/L were commonly used in food fermentation industry. From in-vitro probiotic assay is obtained the best LAB isolate (K1-1242) with resistance to pH 2.5 is 43.53%, resistance to pH 3.0 is 69.86%, resistance to 3% Oxgall is 4.22%, the diameter of the zone inhibition is 10.14 mm against E. coli and 8.73 mm against S. aureus. Observation via SEM discovered of rod-shaped cells with EPS filament between two cells. EPS from LAB is potential for further in-vivo assay to assure its pharmaceutical properties.

Keywords : LAB, Exopolysaccharides, Probiotic, Sour Pickled Mustard

PENDAHULUAN

Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya kesehatan, telah membawa perubahan pola hidup untuk mengkonsumsi pangan fungsional, yaitu

pangan yang mengandung suatu komponen tertentu dan memberikan efek positif bagi kesehatan tubuh. Bakteri Asam Laktat (BAL) berkontribusi besar memberikan manfaat fungsional bagi tubuh manusia sebagai bakteri probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup dalam bahan pangan yang tercatat dalam jumlah cukup serta memberikan manfaat kesehatan saluran pencernaan [1]. Probiotik mempunyai manfaat terapeutik seperti membantu pengobatan *lactose intolerance*, mencegah kanker usus besar, dan menurunkan kadar kolesterol dalam darah.

Beberapa jenis BAL dapat mensintesis *Extracellular polysaccharide* atau eksopolisakarida (EPS), yang merupakan polimer polisakarida yang disekresikan oleh mikroba keluar sel. Saat ini eksplorasi BAL penghasil EPS semakin meningkat karena kemampuan bakteri asam laktat mensintesis EPS dinilai penting bagi kesehatan. Beberapa fakta kesehatan berhubungan dengan kemampuan strain probiotik untuk menempel pada mukosa usus. EPS hasil produksi dari BAL dapat menempel pada mukosa usus halus sehingga meningkatkan kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen [2]. EPS berkontribusi pada kesehatan manusia karena memiliki aktivitas *anti tumoral, anti ulcer,* anti-inflamasi, anti-infeksi, dan meningkatkan sistem imun tubuh *(imunostimulator).* Di samping itu EPS bermanfaat sebagai penstabil dan pengental alami pada produk yogurt.

Selain pada produk fermentasi susu, BAL banyak dijumpai pada berbagai bahan hasil pertanian di antaranya kubis, sawi asin, dan lain-lain. 4 isolat BAL berhasil diisolasi dari fermentasi sawi asin *(Brassica juncea)* yang memiliki kemampuan produksi EPS tinggi [3] namun belum diketahui apakah keempat isolat tersebut memiliki kemampuan sebagai bakteri probiotik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri asam laktat indigenus yang diperoleh dari hasil isolasi fermentasi sawi asin [3] yang diberi inisial isolat K1-12432, K1-1242, K1-12811, dan K1-12371. Untuk isolat pembanding digunakan isolat yang telah diuji dan bersifat probiotik yaitu isolat *L. casei* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Bakteri patogen yang digunakan untuk pengujian antibakteri yaitu *S. aureus* dan *E. coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Media yang digunakan yaitu MRSB *(de Mann Rogose Sharpe Broth)* dan MRSA *(de Mann Rogose Sharpe Agar)* merek Merck, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), dan MHA (*Mueller Hinton Agar*) merek Oxoid. Bahan kimia yang dibutuhkan yaitu HCL 37%, garam *Oxgall* merek Difco, alkohol 75%, alkohol 96%, formaldehid 37%, aseton 99%, kapas, aquades, spiritus, *cotton swab sterile,* cakram disk merek Oxoid.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF) lokal, inkubator dan oven merek Binder Jerman, autoklaf merek Hirayama model HL-36Ae Jepang, pH meter merek Hannah, spektrofotometer merek *Bio-Rad SmartSpec Plus*, sentrifuse dingin merek *Sorvall Legend Micro 17 Thermo Scientific*, vortex merek *Turbo Mixer*, timbangan analitik merek *Mettler* Toledo, refrigerator, kompor listrik merek Maspion, mikropipet merek Acura 815 Socorex, *colony counter* WTW BZG 30, *Scanning Electron Microscope* merek Hitachi TM 3000 *Tablet Microscope*, ose, pinset, dan seperangkat *glassware* seperti cawan petri, tabung reaksi, dan erlenmeyer.

Desain dan Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara deskriptif yang terdiri dari tujuh tahap, tahap pertama yaitu persiapan dan pengawetan kultur BAL, dilanjutkan tahap kedua berupa tahap pengujian kemampuan produksi EPS kasar. Tahap ketiga merupakan pengujian sifat probiotik isolat BAL yang terdiri dari ketahanan BAL terhadap pH rendah, ketahanan BAL

terhadap garam empedu (tahap 4) dan aktivitas antimikroba (tahap 5). Tahap keenam merupakan tahap analisa data dan pemilihan isolat terbaik, yang dilanjutkan dengan tahap akhir yaitu observasi via SEM.

Metode Penelitian

1. Persiapan dan Pengawetan Kultur [4]

Isolat BAL asal sawi asin yang berasal dari agar tegak disubkultur sebanyak 2 kali dalam MRSB dan MRSA *slant.* Masing-masing diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Isolat BAL yang belum digunakan, perlu diawetkan pada suhu 4°C (dalam kulkas) dan setiap satu bulan diremajakan kembali.

2. Pengujian Produksi Eksopolisakarida Kasar [5 dalam 3]

Isolat BAL asal sawi asin ditumbuhkan dalam 25 mL MRSB. Dilanjutkan dengan pemisahan sel melalui proses sentrifugasi dingin 4°C 6000 rpm 20 menit, supernatan yang diperoleh didiamkan selama semalam setelah ditambah etanol dingin (95%) 2x volume sampel, dan dilakukan proses sentrifugasi lagi 4°C 6000 rpm 20 menit. *Pellet* yang diperoleh dikeringkan dan ditimbang berat kering EPS.

3. Pengujian Ketahahan Terhadap pH Rendah [6]

Pengujian ketahanan bakteri terhadap pH rendah (2.5) dilakukan mengikuti metode hitungan cawan dengan modifikasi pH media untuk uji keasaman. Sebanyak 10 ml kultur bakteri asam laktat dalam MRSB berumur 24 jam dipanen kemudian diresuspensi masing-masing sebanyak 1% (v/v) ke dalam 9 ml MRSB (kontrol) dan MRSB pH 2.5 dan 3.0 (ditambah HCl 10%) dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 menit. Kultur bakteri dibiakkan pada media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) menggunakan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Uji ketahanan terhadap asam dilakukan tiga kali ulangan. Ketahanan isolat dinyatakan dengan persen ketahanan dan penurunan log setelah waktu penginkubasian.

4. Pengujian Ketahahan Terhadap Garam Empedu [7]

Pengujian ketahanan bakteri terhadap garam empedu dilakukan mengikuti metode hitungan cawan. Sebanyak 10 ml kultur bakteri asam laktat dalam MRSB berumur 24 jam dipanen kemudian diresuspensi masing-masing sebanyak 1% (v/v) ke dalam 9 ml MRSB (kontrol) dan MRSB yang ditambah dengan Oxgall 3% (b/v), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri dibiakkan pada media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) menggunakan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Uji ketahanan terhadap garam *bile* dilakukan tiga kali ulangan. Ketahanan isolat dinyatakan dengan persen ketahanan dan penurunan log setelah waktu penginkubasian.

5. Pengujian Aktivitas Antimikroba [8]

Pengujian aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode difusi cakram (*Kirby-Bauer Disk*). Bakteri patogen yang ditumbuhkan dalam media NB selama 24 jam dikonsentrasikan 10^{8} dengan spektrofotometer kemudian digoreskan ke dalam medium MHA yang telah mengeras di cawan petri menggunakan *cotton swab sterile* hingga merata. Kertas cakram yang telah direndam supernatan metabolit isolat BAL ditempelkan ke permukaan agar dengan bantuan pinset. Setelah penginkubasian 24 jam pada suhu 37°C akan terbentuk zona penghambatan, yaitu diameter zona bening di sekitar kertas cakram. Diameter zona bening ini diukur dengan jangka sorong dalam satuan sentimeter. Uji aktivitas antimikroba ini diulang sebanyak tiga kali.

6. Observasi via Scanning Microscope Electron (SEM) [9]

Proses pegamatan morfologi bakteri melalui SEM diperlukan tahapan preparasi yang meliputi fiksasi kimiawi dalam larutan formaldehid 0.1 M pH 6.8 selama 30 menit. Dilanjutkan

dengan proses dehidrasi oleh ethanol bertingkat (20%, 50%, 70%, 96%, *absolute*) masing-masing selama 15 menit. Pengeringan dengan penetesan aseton betingkat (20%, 50%, 70%, 99%) dan pelapisan emas. Selanjutnya preparat dimasukkan ke perangkat SEM dan dilakukan eksplorasi dan observasi terhadap sampel uji.

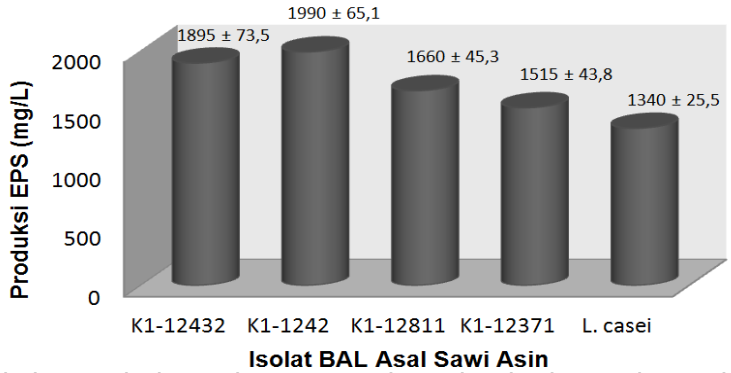
Prosedur Analisis

Hasil yang diperoleh dari berbagai jenis pengujian dianalisa secara deskriptif dan dipilih isolat terbaik yang berpotensi sebagai penghasil eksopolisakarida dan berkemampuan probiotik dengan metode ranking [10].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Eksopolisakarida

Keempat isolat BAL dari sawi asin memiliki kemampuan memproduksi eksopolisakarida dengan jumlah yang beragam, yaitu berkisar 1515-1990 mg/L. Isolat K1-1242 memproduksi EPS yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat lain, yaitu sebesar 1990 mg/L. Sedangkan jumlah EPS terendah diproduksi oleh isolat probiotik komersial *L. casei*, yaitu sebesar 1340 mg/L. Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian terdahulu [3] di mana produksi EPS oleh BAL asal sawi asin lebih tinggi daripada isolat probiotik komersial produksi EPS kasar isolat BAL asal sawi asin, berkisar 1514-2539 mg/L. Eksopolisakarida yang didapat dalam penelitian ini merupakan eksopolisakarida kasar (*crude*) karena diperoleh hanya berdasarkan perhitungan gravimeri berat setelah pengeringan, dimana eksopolisakarida yang diperoleh diendapkan menggunakan etanol dingin 96%, dan kemudian dilakukan pengeringan pada suhu ± 100°C [11]. Perbedaan produksi jumlah EPS secara umum dipengaruhi oleh sifat genetis dan fenotif. Sifat genetis merupakan sifat turunan bawaan dari masing-masing spesies yang dipengaruhi oleh susunan gen, sedangkan sifat fenotif cenderung dipengaruhi oleh faktor lingkungan [11].



Gambar 1. Produksi EPS dari 4 Isolat BAL Asal Sawi Asin dan Isolat Probiotik Komersial *L. casei*

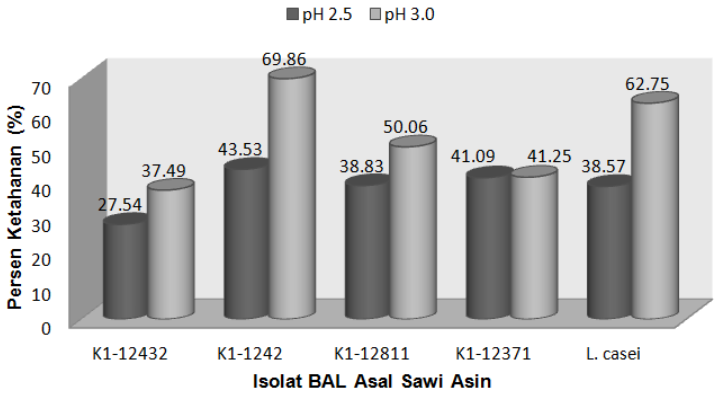
EPS yang diproduksi oleh BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi fermentasi, efek media pertumbuhan (suplementasi mineral), interaksi antar strain *(co-culture fermentation)*, dan teknologi fermentasi *(fed-batch fermentation)* [12]. Regulasi pertumbuhan sel pada pH konstan menghasilkan yield EPS yang lebih baik. Proses asidifikasi terjadi karena produksi laktat mengakibatkan enzim *glycohydrolase* menjadi aktif (kisaran pH 5). Hal ini mengakibatkan yield EPS menurun karena proses enzimatis. Hal ini terjadi pada waktu inkubasi dari 24 hingga 48 jam [13 dalam 14]. Kondisi kultur dan komposisi media (tidak hanya sumber karbon) mempengaruhi yield EPS dan karakterisitik molekuler dari biopolimer tersebut [2]. Sumber karbon yang spesifik memberikan hasil yang berbeda-beda pada setiap spesies. Sukrosa merupakan sumber karbon yang terbaik untuk fermentasi berbagai jenis *Lactobacilli* [15 dalam 14]. Jumlah EPS yang dihasilkan tergantung dari sumber karbon dan nitrogen, serta kondisi fisiko-kimia pertumbuhan bakteri seperti suhu, pH, tingkat keberadaan oksigen, dan lain-lain.

Kemampuan Probiotik

Pengujian probiotik yang dilakukan meliputi ketahanan terhadap pH rendah (2.5 dan 3.0), ketahanan terhadap garam *bile*, dan aktivitas antimikroba.

1. Ketahanan Terhadap pH Rendah

Secara umum ketahanan isolat pada pH 2.5 cenderung lebih rendah daripada pH 3.0. Isolat K1-1242 memiliki ketahanan terhadap pH rendah sebesar 43.53% pada pH 2.5 dan 69.86% pada pH 3.0 di mana ketahanan isolat ini lebih tinggi daripada isolat BAL asal sawi asin yang lain yaitu dan isolat probiotik komersial *L. casei*.



Gambar 2. Ketahanan 4 Isolat BAL Asal Sawi Asin dan *L. casei* pada pH Rendah

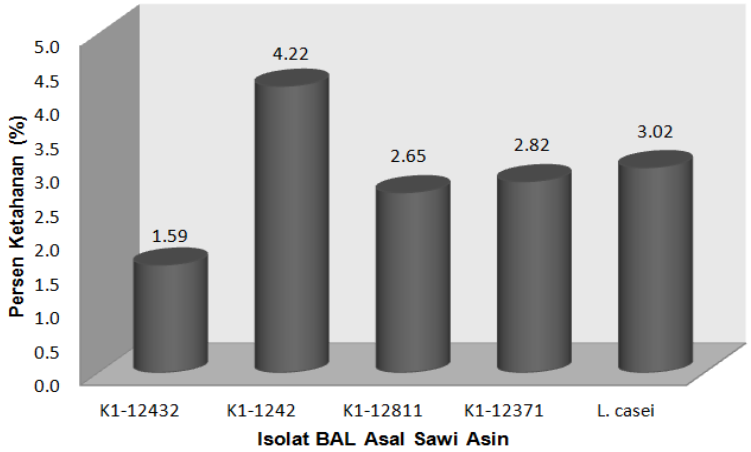
Isolat BAL asal sawi asin dapat bertahan pada kondisi pH 2.5 dan 3.0 dapat disebabkan karena kemampuan isolat tersebut untuk mempertahankan pH dalam selnya lebih netral daripada lingkungan, dapat juga dikarenakan membran sel bakteri tersebut lebih tahan dari paparan asam pada lingkungan. Perbedaan ketahanan membran sel bakteri terhadap kerusakan akibat terjadinya penurunan pH ekstraseluler menyebabkan keragaman ketahanan sel pada pH rendah. Bakteri asam laktat juga mampu mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali daripada pH ekstraseluler, tetapi penurunan pH intraseluler tetap berlangsung seiring dengan menurunnya pH ekstraseluler yang mendukung toleransinya terhadap asam. Untuk mempertahankan pH sitoplasma lebih basa, sel harus memiliki membran yang merupakan barier yang membatasi pergerakan senyawa/proton. Komposisi asam lemak dan protein penyusun yang beragam di antara spesies bakteri diduga mempengaruhi keragaman ketahanan bakteri terhadap pH rendah [16 dalam 4]. Terdapat pula enzim yang terikat pada membran sel yang dapat melakukan reaksi reversible bertindak sebagai pompa yang memindahkan ion. Enzim tersebut mengkatalisa gerakan proton (H^+) menyeberangi membran sel sebagai akibat dari hidrolisis atau sintesis ATP. Ketahanan isolat terhadap pH ekstraseluler yang rendah tergantung dari pengaturan pH internal bakteri [17 dalam 18].

2. Ketahanan Terhadap Garam *Bile*

Semua isolat yang diuji memiliki ketahanan untuk tumbuh dalam media yang mengandung garam oxgall 3% setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat K1-1242 yang mempunyai persen ketahanan yang lebih tinggi daripada isolat kontrol *L. casei* yaitu sebesar 4.22%.

Derajat tahan terhadap garam empedu merupakan karakteristik yang penting bagi bakteri asam laktat, sebab berpengaruh terhadap aktivitasnya dalam saluran pencernaan, terutama saluran usus bagian atas tempat empedu disekresikan [19 dalam 20]. Empedu bersifat sebagai senyawa aktif permukaan. Sifat ini pula yang menyebabkan aktifnya enzim lipolitik yang disekresikan pankreas. Enzim ini bereaksi dengan asam lemak pada membran sitoplasma bakteri sehingga mengakibatkan perubahan struktur membran dan sifat

permeabilitasnya. Keragaman struktur asam lemak pada membran sitoplasma bakteri menyebabkan perbedaan permeabilitas dan karakteristiknya sehingga mungkin mempengaruhi ketahannya terhadap garam empedu [20].



Gambar 3. Ketahanan 4 Isolat BAL Asal Sawi Asin dan *L. casei* pada Oxgall 3%

Kemampuan bertahan dalam konsentrasi garam empedu ini juga berkaitan dengan kemampuan isolat menghasilkan *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Beberapa *Lactobacillus* mempunyai enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) dengan aktivitas untuk menghidrolisa garam empedu, sehingga mampu mengubah sifat fisika-kimia yang dimiliki oleh garam empedu menjadi tidak toksik bagi bakteri asam laktat [6]. Beberapa faktor menentukan reaksi empedu terhadap membran sel, di antaranya konsentrasi empedu, jenis dan struktur empedu, serta arsitektur membran dan komposisi sel berperan penting dalam ketahanan empedu [21].

3. Aktivitas Antimikroba

Sifat antimikroba merupakan suatu kemampuan antagonistik suatu senyawa kimia untuk menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan. Pada penelitian ini digunakan 2 spesies bakteri patogen, yaitu *E. coli* mewakili bakteri Gram negatif dan *S. aureus* mewakili bakteri Gram positif.

Tabel 1. Diameter Penghambatan Isolat BAL dan *L. casei* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Isolat Bakteri Asam Laktat	**Diameter Hambat (mm)**	
	S. aureus	***E. coli***
K1-12432	8.28	10.68
K1-1242	10.14	8.73
K1-12811	10.73	8.33
K1-12371	8.51	8.73
L. casei	8.92	8.56

Secara deskriptif, rata-rata diameter zona hambat terhadap bakteri uji yang tergolong Gram positif (8.28 - 10.73 mm) lebih besar dibanding rata-rata diameter zona hambatan terhadap bakteri Gram negatif (8.33 - 10.68 mm). Pada umumnya bakteri Gram negatif mempunyai ketahanan yang lebih baik terhadap senyawa antimikroba karena memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks, yaitu lapisan luar berupa lipopolisakarida dan lapisan dalam berupa peptidoglikan. Sedangkan struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana, sehingga memudahkan senyawa antimikroba masuk ke dalam sel [22 dalam 23].

Mekanisme antimikroba yang disebabkan oleh asam organik yang dihasilkan isolat BAL asal sawi asin yaitu dengan penurunan pH yang diiringi dengan bentuk tidak terdisosiasi dari

molekul. Pada pH di bawah 5, molekul asam organik yang tidak terdisosiasi sangat tinggi, dalam bentuk tidak terdisosiasi, asam organik cenderung lipofilik dan masuk melalui membran sel. pH dalam sel menjadi lebih rendah yang menyebabkan disosiasi molekul asam sehingga proton (H^+) dan anion terlepas. Banyaknya asam yang tidak terdisosiasi dapat mengubah permebealitas membran sel yang menyebabkan hancurnya sistem transpor bahan pada bakteri tersebut. Hal ini menyebabkan dapat kematian (lisis) sel. Perusakan dinding sel pada bakteri menyebabkan terganggunya sintesis komponen penyusun dinding sel, hal ini menyebabkan dinding sel sangat lemah dan mengalami lisis [24 dalam 23]. Asam organik khususnya asam laktat bersifat bakterisidal pada pH 4,5 dengan konsentrasi di atas 0.2% [25 dalam 26].

Pemilihan Isolat Terbaik

Pemilihan isolat terbaik dilakukan melalui metode ranking [10] yang ditentukan berdasarkan kemampuan masing-masing isolat dalam memproduksi eksopolisakarida, ketahanan setiap isolat terhadap pH rendah dan garam empedu, serta kemampuan menghambat pertumbuhan patogen (aktivitas antimikroba). Ketiga sifat terakhir merupakan sifat utama yang harus dimiliki oleh isolat yang dinyatakan probiotik. Dalam metode ini isolat yang menempati peringkat pertama dinyatakan sebagai isolat yang berkemampuan terbaik, Begitu pula seterusnya, semakin besar peringkat ranking, semakin buruk kemampuannya.

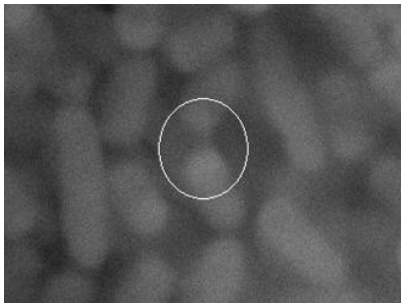
Tabel 2. Ranking Isolat BAL Asal Sawi Asin Berdasarkan Kemampuan Produksi EPS dan Sifat Probiotik Secara *In-Vitro*

Isolat BAL	Eksopolisakarida		% Ketahanan terhadap						Diameter zona bening (mm) terhadap			
	Produksi (mg/L)	Ranking	pH 2,5	Ranking	pH 3,0	Ranking	Bile 3%	Ranking	*S.aureus*	Ranking	*E.coli*	Ranking
K1-12432	1895 ±73.5	2	27.54	4	37.49	4	1.59	4	8.28	4	10.68	1
K1-1242	1990 ±65.1	1	43.53	1	69.86	1	4.23	1	10.14	2	8.73	2
K1-12811	1660 ±45.3	3	38.83	3	50.06	2	2.65	3	10.73	1	8.33	4
K1-12371	1515 ±43.8	4	41.09	2	41.24	3	2.82	2	8.51	3	8.53	3

Secara keseluruhan, isolat K1-1242 mempunyai kemampuan probiotik yang hampir setara dengan isolat kontrol probiotik komersial. Oleh karena itu, isolat K1-1242 dinyatakan sebagai isolat bakteri asam laktat asal sawi asin penghasil eksopolisakarida tinggi dan berpotensi kuat sebagai kandidat probiotik.

Observasi Struktur *Ropy* EPS via SEM

Setelah terpilih isolat K1-1242 sebagai isolat berkemampuan produksi eksopolisakarida dan probiotik terbaik, maka dilakukan pengujian lanjutan untuk melihat struktur *ropy* eksopolisakarida bakteri via *Scanning Microscope Electron* (SEM). Dari hasil pengamatan via *Scanning Microscope Electron* (SEM) perbesaran 15.000x didapatkan morfologi bakteri berbentuk batang (*bacil*) dan ditemukannya filament di ujung sel bakteri yang berinteraksi dengan sel lain. Filament ini diduga kuat sebagai komponen eksopolisakarida yang mengkerut akibat terpapar berbagai reagen kimia selama proses preparasi. Filament ini tidak ditemukan di setiap sel, tetapi di beberapa tempat yang berbeda.



Gambar 4. Hasil Observasi Isolat K1-1242 menggunakan *Scanning Electron Microscope*

SIMPULAN

Dari beberapa pengujian produksi eksopolisakarida dan probiotik secara *in-vitro* didapatkan 1 isolat terbaik (K1-1242) dengan kemampuan produski EPS sebanyak 1990 mg/L, ketahanan terhadap pH 2.5 sebesar 43.53%, ketahanan terhadap pH 3.0 sebesar 69.86%, ketahanan terhadap 3% garam Oxgall sebesar 4.22%, diameter zona hambat sebesar 10.14 mm terhadap *E. coli* dan 8.73 mm terhadap *S. aureus*. Observasi isolat terbaik (K1-1242) via SEM ditemukan sel berbentuk batang dengan filamen EPS yang menghubungkan 2 sel. Dengan demikian isolat BAL asal sawi asin dapat dikatakan sebagai BAL penghasil EPS dan berkemampuan probiotik yang memiliki banyak manfaat kesehatan dan berpotensial untuk digunakan dalam industri fermentasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan Nasional Republik Indonesia selaku pendukung finansial utama penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) tahun 2012 serta panitia penyelangara Seminar Nasional PATPI Jember 2013 di mana penelitian ini dipresentasikan oral.

DAFTAR PUSTAKA

1) Fuller R. 1989. Probiotics in Man and Animal. A Reviewer: *Journal Application Bacteriology.* 66:365-378
2) Ruas-Madiedo P and C.G de los Reyes-Gavilán. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 88:843-856
3) Amalia R.D. 2012. Eksplorasi Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Sawi Asin (*Brassica juncea*). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
4) Valentine, V. 2006. Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Bekatul Secara In Vitro. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
5) Tallon R, P Bressollier and MC Urdaci. 2006. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643409. Tanggal akses: 25/10/2013.
6) Evanikastri. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Sampel Klinis yang Berpotensi sebagai Probiotik. Tesis. IPB. Bogor
7) Kusumawati, N. 2002. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Mempertahankan Keseimbangan Mikroflora Feses dan Mereduksi Kolesterol Serum Darah Tikus. Tesis. IPB. Bogor
8) Vonistra FT. 2011. Isolasi Bakteri *Vibrio alginoliticus* yang Bersimbiosis dengan Sponge (*Haliclona Sp.)* serta Aktivitas Daya Hambatnya terhadap *Staphylococcus aureus dan Salmonella typhi*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
9) Kaláb M, Ann-Fook Yang, Denise Chabot. 2008. Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria. http://www.rms.org.uk/Resources/Royal%20Microscopical%20Society/infocus/Images/KALÁB%20ARTICLE.pdf. Tangal akses: 17/05/2013
10) Tabucanon, M. 1988. Multiple Criteria Decision making in Industry. Elsevier Science Publishers. New York
11) Suryawira Y M. 2011. Produksi Eksopolisakaridaoleh Bakteri asam Laktat Pada Medium Sari Kurma dan Sari Murbei. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
12) Farnworth, ER, CP Champagne, *and* MR Van Calsteren. 2006. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Food Uses, Production, Chemical Structures, and Health Effects.

Dalam Goktepe, I, VK Juneja, *and* M Ahmedna (ed). Probiotics in Food Safety and Human Health. CRC Taylor & Francis Group. USA
13) Pham PL, Dupont I, Roy D, Lapointe G, *and* Cerning J. 2000. Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus Rhamnosus* And Analysis of Its Enzymatic Degradation During Prolonged Fermentation*. Appl Environ Microbiol* 66:2302–10
14) Badel S, T Bernardi, P Michaud. 2011. New Prespectives for Lactobacilli Exopolysaccharides. *Biotecnology Advances* 29 (2011) 54-56 DOI:10.1016/j.biotechadv.2010.08.011
15) Van Geel Schutten GH, Flesh F, Ten Brinck B, Smith MR, Dijkhuizen L. 1998. Screening and characterization of Lactobacillus strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Biol Biotechnol* 1998;50:697–703
16) Siegumfeldt H, Rechninger BK, Jacobsen M*.* 2000. Dynamic Changes of Intraceluller pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to A Rapid Drop in Extracelluler pH. *Appl. Environ. Microbiol* 66:2330-2335
17) Nannen NL *and* Hutkins RW. 1991. Intracelluler pH Effect in Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci* 74:741-746
18) Kusumawati, R. 2006. Evaluasi Potensi Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Indigenus Asal Bekatul Secara In Vitro. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
19) Gilliand SE, TE Staley, LJ Bush. 1984. Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophillus* Used as A Dietary Adjunct. *J. Dairy Sci.* 67:3045-3051
20) Susanti I, Retno W K, Fatim I. 2007. Uji Sifat Probiotik Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Bahan Pangan Fungsional. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan,* Vol XVIII No.2 Th. 2007
21) Begley, M, Cormac GMG, *and* C Hill. 2004. The Interaction Between Bacteria and Bile. Elsevier B.V. Federation of European Microbiological Societies
22) Pelczar MC, ECS Chan, NR Krieg. 1993. Microbiology Concepts and Applications. Mc Graw-Hill, Inc. New York
23) Purwohadisantoso K. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Sayur kubis Yang Memiliki Kemampuan Penghambatan Terhadap Bakteri Patogen. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
24) Ray, B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC Press. Bocaraton
25) Ray, B *and* M Daeschel. 1992. Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press. Boca Raton
26) Rachmawati I, Suranto, dan Ratna S. 2005. Uji Antibakteri Bakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen*. Bioteknologi* (2) : 43-48. ISSN: 0216-6887