

## Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla spp.*) Sebagai Kandidat Probiotik

### Activity Enzymatic of Isolate Lactic Acid Bacteria from the Digestive Tract of Mud Crab (*Scylla spp.*) as a Candidate Probiotics

Pipin Suciati<sup>1\*</sup>, Wahyu Tjahjaningsih<sup>2</sup>, Endang Dewi Masithah<sup>2</sup> dan Heru Pramono<sup>\*\*2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Surabaya

\* pipin-s-11@fpk.unair.ac.id

\*\*heruiwak@gmail.com

#### Abstrak

Probiotik dapat didefinisikan sebagai mikroba hidup yang ditambahkan dalam jumlah tertentu yang mampu bertahan hidup dalam ekosistem saluran pencernaan. Enzim yang dihasilkan oleh mikroba yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan dapat digunakan sebagai probiotik. Enzim proteolitik ekstraseluler secara alami diproduksi oleh mikroba untuk menghidrolisis polipeptida dalam media menjadi peptida dan asam amino. Bakteri asam laktat dapat menghasilkan enzim seperti protease,  $\alpha$ -amilase, fitase, kitinase, lipase. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla spp.*) yang mempunyai aktivitas proteolitik. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif berupa aktivitas enzimatis dan karakterisasi uji biokimia isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla spp.*). Jumlah kepiting bakau yang digunakan adalah 10 ekor. Hasil penelitian didapatkan tiga isolat bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas proteolitik kuat, yaitu WK 28, WK 33, dan WK 53. Hasil uji biokimia isolat WK 28 termasuk ke dalam genus *Pediococcus sp.*, isolat WK 33 termasuk ke dalam *Lactobacillus sp.*, dan isolat WK 53 termasuk ke dalam genus *Streptococcus sp.* WK 28 (*Pediococcus sp.*) dan WK 33 (*Lactobacillus sp.*) mempunyai aktivitas proteolitik dan aktivitas lipolitik. Isolat WK 53 (*Streptococcus sp.*) mempunyai aktivitas enzimatis yaitu aktivitas proteolitik, amilolitik, dan lipolitik.

Kata kunci: Kepiting bakau, proteolitik, amilolitik, lipolitik

#### Abstract

Probiotics are defined as live microbes are added in a certain amount that is able to survive in the digestive tract ecosystem. Enzymes produced by microbes isolated from the digestive tract of fish can be used as probiotics. Extracellular proteolytic enzymes naturally produced by the microbes to hydrolyze a polypeptide in a media into peptides and amino acids. Lactic acid bacteria can produce enzymes such as proteases,  $\alpha$ -amylase, phytase, chitinase, lipase. This study aims to get the lactic acid bacteria isolates from the gastrointestinal tract of mangrove crab (*Scylla spp.*) That have proteolytic activity. This research uses descriptive method such as enzymatic activity and biochemical characterization of isolates of lactic acid bacteria from the digestive tract of mangrove crab (*Scylla spp.*). Amount of mud crab used is 10 fish. The result showed three isolates of lactic acid bacteria that have a strong proteolytic activity, namely WK 28 WK 33 and WK 53. The results of biochemical tests WK 28 isolates belonging to the genus *Pediococcus sp.*, Isolate WK 33 belonging to the *Lactobacillus sp.*, And WK 53 isolates belonging to the genus *Streptococcus sp.* WK 28 (*Pediococcus sp.*) And WK 33 (*Lactobacillus sp.*) Have proteolytic activity and lipolytic activity. Isolates WK 53 (*Streptococcus sp.*) Have enzymatic activity is proteolytic activity, amylolytic, and lipolytic.

Keywords: Mud crab, lactic proteolytic, amylolytic, lipolytic

## Pendahuluan

Salah satu upaya untuk meningkatkan fungsi fisiologis ikan, terutama kemampuan dalam mencerna pakan adalah dengan menambahkan probiotik dalam pakan. Penambahan probiotik dalam pakan diharapkan dapat masuk dalam saluran pencernaan komoditas budidaya (Jusadi dkk., 2004). Probiotik didefinisikan sebagai mikroba hidup yang ditambahkan dalam jumlah tertentu yang mampu bertahan hidup dalam ekosistem saluran pencernaan. Mikroba probiotik memiliki peran positif pada inang. Peran mikroba tersebut berpengaruh terhadap kesehatan dan nutrisi inang (Gismondo *et al.*, 1999). Probiotik bermanfaat dalam mengatur keseimbangan mikroba pada saluran pencernaan dan menghambat perkembangan mikroba patogen pada saluran pencernaan (Salminen *et al.*, 1999) serta mensekresikan enzim yang membantu proses pencernaan makanan. Peningkatan daya cerna menunjukkan semakin tinggi nutrisi yang tersedia untuk diserap tubuh (Jusadi dkk., 2004).

Menurut Lengkey dan Soeharsono (2010), mikroba probiotik adalah bakteri Gram positif, contohnya genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Bakteri yang digunakan sebagai probiotik antara lain termasuk dalam spesies *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*,

*Lactobacillus plantarum*), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium thermophilum*), dan *Streptococcus lactis*. Menurut Chotimah (2009), *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* tergolong dalam bakteri asam laktat (BAL).

Menurut Hardiningsih dkk. (2006), bakteri asam laktat tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan sehingga sering digunakan pada industri pengawetan makanan, minuman serta berpotensi sebagai produk probiotik. Seiring dengan perkembangan penggunaan probiotik dalam kegiatan budidaya, perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas enzimatis isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla* spp.) dalam memproduksi enzim yang berperan dalam pencernaan.

## Materi dan Metode

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu kepiting bakau (*Scylla* spp.) dewasa dengan ukuran 7-10 cm dan berat 90-100 gram sebanyak 10 ekor yang didapatkan dari pedagang pengumpul kepiting bakau di hutan bakau Wonorejo Surabaya. Bahan yang digunakan yaitu media selektif de Man Rogosa Sharpe (MRS), 0,5% CaCO<sub>3</sub>, air laut, alkohol 70%, kapas, kertas pH, skim milk, bacto agar, amilum, lugol,

minyak zaitun, *paper disk blank*, larutan NaCl fisiologis, akuades dan air laut. Media untuk uji biokimia yaitu media MIO, media TSIA, media uji O/F parafin, media glukosa, zat warna Gram, *paper oksidase*, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Peralatan yang digunakan dalam proses isolasi yaitu pinset, alat seksio, Petri *dish*, tabung reaksi, autoklaf, pipet ukur, pipet tetes, Beaker *glass*, bunsen, mikrotub, pinset, oven, timbangan analitik, tabung Erlenmeyer, Ose, dan Refraktometer.

### **Prosedur Penelitian**

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode deskriptif (Rohy dkk., 2014) berupa aktivitas enzimatik dan karakterisasi uji biokimia isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla* spp.).

### **Pembuatan Media**

Media yang digunakan untuk isolasi bakteri asam laktat adalah media MRS agar yang ditambahkan 0,5% CaCO<sub>3</sub> (Khunajarkr *et al.*, 2008). Media MRS sebanyak 10,4 gram, *bacto agar* sebanyak tiga gram dan satu gram CaCO<sub>3</sub> dilarutkan dengan air laut 200 ml ke dalam Erlenmeyer. Media MRS agar dengan penambahan CaCO<sub>3</sub> disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit, kemudian dituang pada Petri *dish*.

### **Pengambilan Sampel Saluran Pencernaan Kepiting Bakau**

Pengambilan sampel saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla* spp.) dewasa baik jantan dan betina dari 10 ekor sebagai sumber inokulum. Sampel saluran pencernaan diambil dengan cara membuka karapas kepiting bakau kemudian pada saluran pencernaan dipotong mulai dari anterior lambung sampai pada posterior usus.

### **Penanaman Bakteri**

Sampel diambil sebanyak 0,5 gram untuk diencerkan dengan 4,5 ml air laut yang steril dalam tabung reaksi (10<sup>-1</sup>). Pengenceran dilanjutkan hingga seri pengenceran 10<sup>-2</sup>. Metode penanaman dilakukan dengan metode permukaan (*surface/spread plate*) (Sumarsih dkk., 2010). Sampel diambil 1 ml dan diinokulasi pada media MRS agar yang telah ditambah 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama satu sampai dua hari dengan posisi cawan Petri terbalik (Setyadi dan Subagiyo, 2012).

### **Pemurnian Isolat Bakteri**

Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan metode *streak plate* pada media MRS agar yang telah ditambah 0,5% CaCO<sub>3</sub> kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Media MRS merupakan media

selektif untuk pertumbuhan bakteri asam laktat (Yelnetty *et al.*, 2014).

### **Seleksi Bakteri Asam Laktat Proteolitik**

Seleksi bakteri asam laktat proteolitik dilakukan dengan uji aktivitas proteolitik pada media agar dengan menggunakan 1% *skim milk* (Nespolo *et al.*, 2010). Uji aktivitas proteolitik dilakukan dengan prosedur Benson (2001) yaitu kultur cair isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang kemudian ditempatkan pada media *skim milk* agar (1%), diinkubasi pada suhu 30°C selama 1-3 hari. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset.

Aktivitas proteolitik tampak dari terbentuk zona jernih di sekitar *paper disc*. Uji aktivitas proteolitik pengamatan dilakukan selama tiga hari. Berdasarkan tingkat kemampuan menghidrolisis protein yang dihasilkan oleh masing-masing isolat ditunjukkan berupa zona jernih, dipilih tiga isolat dengan kemampuan menghidrolisis tiga terbesar (Triyanto dkk., 2009). Hasil seleksi uji aktivitas proteolitik, tiga isolat bakteri asam laktat selanjutnya dilakukan karakterisasi yaitu dengan uji biokimia.

### **Uji Biokimia**

#### **Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan dengan mencekkan beberapa larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada kultur bakteri. Sifat reaksi terhadap uji katalase ditentukan dengan terbentuk gelembung gas yang memberikan indikasi pembentukan air dan oksigen dari hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Benson, 2001).

### **Uji Morfologi dan Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi bentuk koloni, warna koloni, elevasi koloni, dan bentuk sel (bulat, bulat batang, tetrad, batang) serta menentukan kelompok bakteri yaitu bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif (Benson, 2001).

### **Produksi Hidrogen Sulfida**

Pengujian produksi hidrogen sulfida bertujuan untuk menentukan sifat produksi H<sub>2</sub>S dan fermentasi karbohidrat. Media yang digunakan adalah media TSIA. Produksi H<sub>2</sub>S ditandai dengan terbentuk warna hitam pada dasar media. Fermentasi karbohidrat menyebabkan warna media berubah dari oranye kemerahan menjadi warna kuning (Benson, 2001).

### **Motilitas**

Pengujian motilitas bertujuan untuk mengetahui bakteri bersifat motil atau tidak. Uji motilitas dilakukan dengan cara menu-

sukkan inokulasi bakteri pada media *soft* agar (MIO). Bakteri bersifat motil akan terlihat penyebaran bakteri pada media (Benson, 2001).

### **Oksidase**

Tujuan uji oksidase adalah untuk membedakan kelompok bakteri dengan menggunakan *paper oksidase*. Pengelompokan bakteri dengan uji oksidase diketahui adanya perubahan warna yang terjadi pada *paper oksidase*. Reaksi uji oksidase positif apabila terjadi perubahan warna pada *paper oksidase* menjadi biru yang nampak dalam waktu 10-15 detik (Benson, 2001).

### **Oksidatif / Fermentatif**

Uji O/F medium (oksidatif/fermentatif) bertujuan untuk mengetahui sifat oksidasi atau fermentasi bakteri terhadap glukosa. Bakteri oksidatif memanfaatkan oksigen untuk menghasilkan karbondioksida dan air, memanfaatkan glukosa sebagai donor elektron dan oksigen sebagai sumber elektron utama. Bakteri bersifat oksidatif apabila media uji O/F berwarna biru. Bakteri fermentatif memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi, dengan menghasilkan produk akhir karbondioksida dan air. Bakteri bersifat fermentatif apabila media uji O/F berwarna kuning (Benson, 2001).

### **Uji Glukosa**

Uji glukosa bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam menfermentasikan glukosa dan menghasilkan asam organik serta menghasilkan gas. Uji glukosa positif apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada media uji glukosa (Benson, 2001).

### **Uji Aktivitas Proteolitik II**

Uji aktivitas proteolitik pada media agar dengan menggunakan 1% *skim milk* (Nespolo *et al.*, 2010). Uji aktivitas proteolitik dilakukan dengan prosedur Benson (2001), yaitu kultur cair isolat yang diperoleh dari hasil isolasi diinokulasikan ke *paper disc blank* yang kemudian ditempatkan pada media *skim milk* agar (1%), diinkubasi pada suhu 30°C selama 1-3 hari. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset. Aktivitas proteolitik tampak dari terbentuk zona jernih di sekitar *paper disc*. Uji aktivitas proteolitik II pengamatan dilakukan selama tujuh hari.

### **Aktivitas Amilolitik**

Uji aktivitas amilolitik dilakukan pada media agar dengan 1% amilum atau pati (Fossi *et al.*, 2005). Uji aktivitas amilolitik dilakukan dengan prosedur Benson (2001),

yaitu kultur cair isolat bakteri asam laktat proteolitik diinokulasikan ke *paper disc blank* yang kemudian ditempatkan pada media agar dengan 1% amilum, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset. Hasil aktivitas enzim amilase ekstraseluler ditunjukkan oleh terbentuk zona jernih di sekitar koloni. Pengamatan zona jernih di sekitar koloni dilakukan dengan penambahan lugol pada media (Fossi *et al.*, 2005).

### **Aktivitas Lipolitik**

Uji aktivitas lipolitik dilakukan pada media MRS agar dengan penambahan 2 ml minyak zaitun dalam 100 ml media MRS agar (Svetlitsshnyl *et al.*, 1996). Uji aktivitas lipolitik dilakukan dengan cara kultur cair isolat bakteri asam laktat proteolitik diinokulasikan ke *paper disc blank* dari kertas saring kemudian ditempatkan pada media MRS agar dengan penambahan 2 ml minyak zaitun. Inkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam (Benson, 2001). Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan *paper disc* ke dalam kultur cair isolat bakteri menggunakan pinset. Aktivitas enzim lipase bakteri asam laktat ditandai dengan terbentuk zona jernih di sekitar koloni yang

menunjukkan bahwa media larut atau terhidrolisis.

### **Parameter Penelitian**

Parameter dalam penelitian ini adalah aktivitas enzimatik dan karakterisasi isolat bakteri asam laktat. Aktivitas enzimatik tersebut meliputi aktivitas proteolitik, amilolitik, dan lipolitik. Karakterisasi bakteri asam laktat yaitu dengan uji biokimia. Pengamatan dilakukan secara makroskopik dan secara mikroskopik.

### **Analisa Data**

Data hasil uji aktivisasi enzimatik dan karakterisasi isolat bakteri asam laktat Di analisis secara deskriptif. Data diperoleh dari hasil uji aktivitas enzimatik yaitu aktivitas proteolitik, amilolitik, dan lipolitik serta uji biokimia kemudian dianalisis dan dilengkapi dengan Tabel dan Gambar.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **Hasil Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat**

Hasil isolasi 10 ekor kepiting bakau (*Scylla* spp.) diperoleh 96 isolat bakteri yang tumbuh pada media de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar dengan penambahan 0,5% CaCO<sub>3</sub>. Hasil permurnian isolat diperoleh sebanyak 65 isolat bakteri asam laktat, kemudian dilanjutkan seleksi bakteri asam laktat proteolitik.

### Seleksi Bakteri Asam Laktat Proteolitik

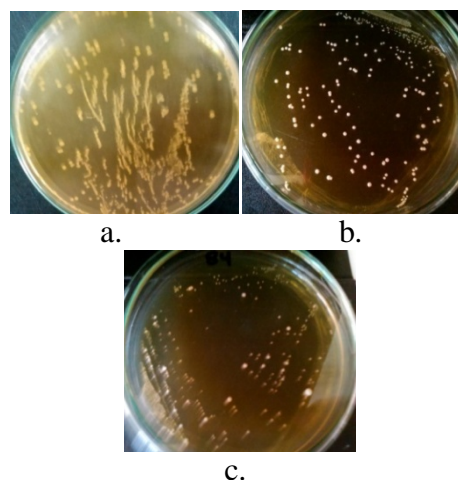
Seleksi bakteri asam laktat proteolitik dilakukan dengan uji aktivitas proteolitik dari 65 isolat bakteri asam laktat hasil pemurnian. Berdasarkan hasil uji aktivitas proteolitik didapatkan tiga isolat bakteri asam laktat yang mempunyai aktivitas proteolitik kuat ditandai dengan terbentuk zona jernih. Zona jernih di sekitar koloni merupakan hasil aktivitas hidrolisis protein pada media oleh enzim protease ekstraseluler, tiga isolat tersebut yaitu WK 28, WK 33, dan WK 53. Lebar diameter zona jernih isolat WK 28 adalah 12 mm, isolat WK 33 adalah 9 mm, dan isolat WK 53 adalah 10 mm.

### Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Proteolitik

Karakterisasi bakteri asam laktat dilakukan dengan uji morfologi dan uji biokimia. Dari hasil uji morfologi koloni (Gambar 1) dan uji biokimia dibandingkan dengan buku *Bergey's Determinative Bacteriologi* (Holt *et al.*, 1994) didapatkan kecocokan karakteristik isolat pada jenis bakteri *Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp., dan *Streptococcus* sp (Tabel 1.).

Ciri-ciri morfologi isolat bakteri WK 28 (*Pediococcus* sp.) yaitu bentuk koloni bulat dengan tepian bergerigi berwarna putih susu dengan elevasi cembung. Sel *Pedio-*

*coccus* sp. berbentuk bulat tersusun berantai pendek atau sepasang. Isolat bakteri WK 33 (*Lactobacillus* sp.) mempunyai ciri-ciri bentuk koloni bulat berwarna putih susu dengan elevasi cembung. Sel *Lactobacillus* sp. Berbentuk batang dan lurus tersusun berpasangan. Isolat bakteri WK 53 (*Streptococcus* sp.) mempunyai bentuk koloni bulat berukuran kecil berwarna putih susu dengan elevasi cembung. Sel *Streptococcus* sp. berbentuk bulat tersusun berantai pendek.



Gambar 1. Morfologi koloni bakteri.

Keterangan: a. Isolat WK 28, b. Isolat WK 33, c. Isolat WK 53

Hasil uji biokimia menunjukkan isolat bakteri WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Streptococcus* sp.) bersifat positif terhadap pewarnaan Gram, katalase negatif, oksidase negatif, glukosa positif, *metil red* (MR) negatif, *voges proskauer* (VP) negatif, tidak meng-

hasilkan gas dan H<sub>2</sub>S serta bersifat fermentatif pada uji O/F. Bakteri *Pediococcus* sp. dan *Lactobacillus* sp. bersifat non motil, sedangkan bakteri *Streptococcus* sp. bersifat

motil. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Streptococcus* sp.) dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Hasil uji biokimia

Isolat	TSIA	Gas	H <sub>2</sub> S	O/F	Glukosa	Motilitas	Oksidase	Katalase	Gram
WK 28 ( <i>Pediococcus</i> sp.)	-	-	-	F	+	-	-	-	+
WK 33 ( <i>Lactobacillus</i> sp.)	-	-	-	F	+	-	-	-	+
WK 53 ( <i>Streptococcus</i> sp.)	-	-	-	F	+	+	-	-	+

## Kemampuan Aktivitas Proteolitik II

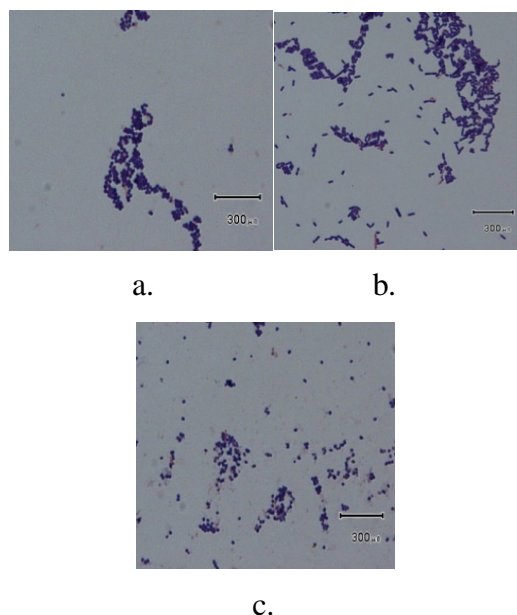
### Isolat Bakteri Asam Laktat

Berdasarkan hasil seleksi aktivitas proteolitik isolat bakteri asam laktat diperoleh tiga isolat bakteri asam laktat yang mempunyai aktivitas proteolitik kuat ditandai dengan terbentuk zona jernih, tiga isolat tersebut yaitu WK 28, WK 33, dan WK 53. Hasil uji morfologi dan uji biokimia isolat bakteri asam laktat proteolitik dibandingkan dengan buku *Bergey's Determinative Bacteriologi* (Holt *et al.*, 1994) didapatkan kecocokan karakteristik bakteri isolat WK 28 termasuk dalam Genus *Pediococcus* sp., isolat WK 33 termasuk

dalam Genus *Lactobacillus* sp., dan isolat WK 53 termasuk dalam Genus *Streptococcus* sp. Tiga isolat tersebut kemudian dilakukan uji aktivitas proteolitik II. Uji aktivitas proteolitik II dilakukan pengamatan selama tujuh hari untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease ekstraseluler berupa zona jernih di sekitar koloni yang merupakan hasil hidrolisis enzim protease (Gambar 3). Hasil uji aktivitas proteolitik II dapat dilihat pada Tabel 2.

### Kemampuan Aktivitas Amilolitik dan Aktivitas Lipolitik





Gambar 2. Pewarnaan Gram isolat bakteri asam laktat

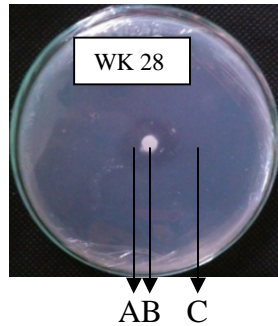
Keterangan : a. Isolat bakteri WK 28 (*Pediococcus* sp.), b. Isolat bakteri WK 33 (*Lactobacillus* sp.), c. Isolat bakteri WK 53 (*Streptococcus* sp.).

Hasil uji aktivitas amilolitik isolat WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Streptococcus* sp.) menunjukkan bahwa isolat WK 53 (*Streptococcus* sp.) mampu menghasilkan enzim amilase ekstraseluler ditunjukkan dengan terbentuk zona jernih di sekitar koloni. Zona

jernih di sekitar koloni merupakan hasil aktivitas hidrolisis amilum oleh amilase ekstraseluler. Isolat WK 28 (*Pediococcus* sp.) dan WK 33 (*Lactobacillus* sp.) tidak menghasilkan enzim amilase ekstraseluler ditandai dengan tidak terbentuk zona jernih di sekitar koloni (Gambar 4).

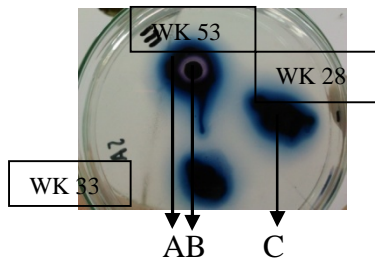
Tabel 2. Data diameter zona jernih uji aktivitas proteolitik II

No	Isolat	Diameter zona jernih (mm)						
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7
1.	WK 28 ( <i>Pediococcus</i> sp.)	18	18	19	24	28	28	28
2.	WK 33 ( <i>Lactobacillus</i> sp.)	13	14	14	18	22	26	30
3.	WK 53 ( <i>Streptococcus</i> sp.)	11	14	14	30	30	30	32



Gambar 3. Uji aktivitas proteolitik

Keterangan: A. Zona jernih, B. Koloni bakteri, C. Media tidak terhidrolisis.



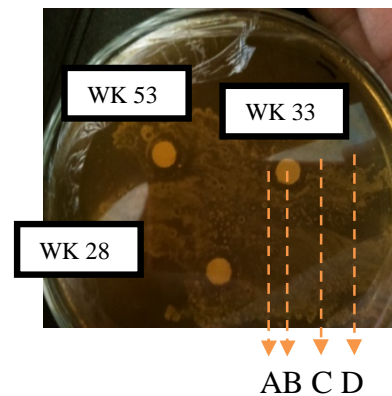
Gambar 4. Uji aktivitas amilolitik

Keterangan: A. Zona jernih, B. Koloni bakteri, C. Media tidak terhidrolisis.

Hasil uji aktivitas lipolitik menunjukkan terbentuk zona jernih di sekitar koloni pada media MRS agar dengan penambahan 2 ml minyak zaitun (Gambar 5). Isolat WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Streptococcus* sp.) mampu menghasilkan enzim lipase ekstraseluler.

Isolasi bakteri adalah memisahkan bakteri dari lingkungan dan menumbuhkan sebagai biakan pada media buatan (Suryani dkk., 2010). Menurut Khunajarkr *et al.* (2008), isolasi bakteri asam laktat dilakukan

dengan menggunakan media MRS agar dengan penambahan 0,5%  $\text{CaCO}_3$ . Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh membentuk zona jernih di sekitar pertumbuhan koloni pada media MRS agar dengan penambahan 0,5%  $\text{CaCO}_3$ . Zona jernih terbentuk karena bakteri menghasilkan metabolit sekunder berupa asam laktat yang berlebih sehingga kelebihan asam laktat ditunjukkan dengan terbentuk zona jernih (Melliawati dkk., 2015).



Gambar 5. Uji aktivitas lipolitik

Keterangan: A. Zona jernih, B. Koloni bakteri, C. Asam lemak bebas, D. Media tidak terhidrolisis.

Hasil penelitian isolasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kepiting bakau didapatkan sebanyak 65 isolat yang mempunyai zona jernih dan bersifat katalase negatif. Menurut Hardiningsih dkk. (2006), zona jernih yang terbentuk diduga bakteri asam laktat, selanjutnya dilakukan uji katalase. Zona jernih yang terbentuk serta kata-

lase negatif merupakan karakteristik bakteri asam laktat.

Hasil pemurnian isolat yaitu sebanyak 65 isolat bakteri asam laktat dilanjutkan pada uji aktivitas proteolitik I. Hasil uji aktivitas proteolitik I dipilih tiga isolat yaitu isolat WK 28 dengan diameter zona jernih 12 mm, isolat WK 33 dengan diameter zona jernih 9 mm, dan isolat WK 53 dengan diameter zona jernih 10 mm. Isolat bakteri asam laktat WK 28, WK 33, dan WK 53 selanjutnya dilakukan karakterisasi dengan uji biokimia. Hasil uji biokimia pada Tabel 1. dibandingkan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Hasil uji biokimia menunjukkan isolat WK 28 termasuk ke dalam genus *Pediococcus* sp., isolat WK 33 termasuk ke dalam *Lactobacillus* sp., dan isolat WK 53 termasuk ke dalam genus *Streptococcus* sp.

Menurut Holt *et al.*, (1994), bakteri *Pediococcus* sp. berbentuk bulat berantai pendek, beberapa berpasangan dan tidak membentuk rantai. Diameter sel *Pediococcus* sp. 1.0-2.0  $\mu\text{m}$ . Bakteri *Pediococcus* sp. bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, katalase negatif, tidak menghasilkan nitrat. pertumbuhan optimum pada suhu 25°–40°C. Menurut Holt *et al.*, (1994), bakteri *Lactobacillus* sp. berbentuk batang berantai pendek umumnya berukuran 0.5-1.2 x

1.0-10.0  $\mu\text{m}$ . Bakteri *Lactobacillus* sp. Bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, dan bersifat mikroaerofilik. Bakteri *Lactobacillus* sp. tumbuh optimum pada suhu 30-40°C. Menurut Holt *et al.*, (1994) bakteri *Streptococcus* sp. berbentuk bulat, diameter sel berukuran 0.5-2.0  $\mu\text{m}$ . Bakteri *Streptococcus* sp. bersifat non motil, tidak membentuk spora, Gram positif, fakultatif anaerob, katalase negatif. Bakteri *Streptococcus* sp. tumbuh pada kisaran suhu 25-45 °C, optimum pada suhu 37°C.

Uji aktivitas proteolitik II menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik isolat WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Streptococcus* sp.) terus meningkat sampai pada hari ke tujuh berdasarkan diameter zona jernih yang dihasilkan. Menurut Yusmarini dkk. (2009), aktivitas proteolitik yang terus mengalami peningkatan hal tersebut karena bakteri mampu tumbuh dan berkembangbiak. Bakteri pada fase pertumbuhan menghasilkan metabolit primer berupa enzim protease ekstraseluler, semakin besar zona jernih yang dihasilkan menunjukkan semakin besar kemampuan isolat tersebut menghasilkan enzim protease.

Tujuan uji aktivitas proteolitik bakteri asam laktat adalah untuk mengetahui aktivitas enzim protease ekstraseluler pada

bakteri. Enzim protease ekstraseluler secara alami diproduksi oleh mikroba untuk menghidrolisis polipeptida dalam media menjadi peptida dan asam amino (Wilson *and* Remigio, 2012). Asam amino selanjutnya digunakan bakteri untuk pertumbuhan terutama senyawa nitrogen yang akan masuk ke dalam sel bakteri (Setyati dan Subagiyo, 2012).

Senyawa nitrogen tidak dapat disintesis oleh bakteri sehingga membutuhkan dari lingkungan hidup bakteri (Benson, 2001). Menurut Pollack *et al.* (2005), sumber senyawa nitrogen dipecah dari asam amino, peptida, pepton dan asam nukleat. Senyawa nitrogen digunakan bakteri untuk memperbaiki sel yang rusak, nutrisi pertumbuhan bakteri, dan sintesis DNA/RNA. Kemampuan menghidrolisis protein sebagai salah satu kriteria seleksi bakteri probiotik.

Uji aktivitas amilolitik bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim amilase ekstraseluler pada media agar dengan 1% amilum. Kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim amilase ekstraseluler ditunjukkan terbentuk zona jernih pada media agar dengan 1% amilum (Sjofjan *and* Ardyati, 2011). Hasil uji aktivitas amilolitik menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat WK 53 (*Streptococcus* sp.) yang mempunyai aktivitas amilolitik dengan menghasilkan

zona jernih di sekitar koloni. Pengamatan zona jernih pada media agar 1% amilum dengan ditetaskan lugol sehingga terlihat zona jernih di sekitar koloni, sedangkan daerah lainnya berwarna biru gelap. Hal tersebut karena terjadi ikatan antara gugus amilum dengan senyawa iodine/lugol (Frobisher, 1962).

Isolat WK 53 (*Streptococcus* sp.) mampu menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Menurut Benson (2001), bakteri menghasilkan enzim amilase untuk menghidrolisis amilum menjadi molekul maltosa, glukosa, dan dekstrin. Menurut Frazier *and* Westhof (1988), glukosa sebagai sumber energi untuk pertumbuhan bakteri. Isolat WK 28 (*Pediococcus* sp.) dan isolat WK 33 (*Lactobacillus* sp.) tidak menghasilkan enzim amilase ekstraseluler ditandai dengan tidak terbentuk zona jernih di sekitar koloni pada media *strach* agar. Menurut Frazier *and* Westhof (1988), setiap bakteri mempunyai kemampuan mensintesis enzim di dalam sel, tetapi hanya beberapa bakteri yang mempunyai enzim ekstraseluler.

Uji aktivitas lipolitik bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim lipase ekstraseluler pada isolat bakteri asam laktat. Uji aktivitas lipolitik pada isolat bakteri asam laktat WK 28 (*Pediococcus* sp.), WK 33 (*Lactobacillus* sp.), dan WK 53 (*Strepto-*

*coccus* sp.) pada media MRS dengan penambahan 2 ml minyak zaitun mampu menghasilkan zona jernih. Menurut Telussa (2013), enzim lipase akan menghidrolisis minyak zaitun dan membentuk asam lemak. Enzim lipase menghidrolisis asam palmiat dalam minyak zaitun menjadi asam lemak bebas berwarna kuning pada media.

Kemampuan bakteri menghidrolisis lemak dengan menghasilkan enzim lipase. Molekul lemak dihidrolisis menjadi molekul gliserol dan asam lemak. Gliserol dan asam lemak digunakan bakteri untuk mensintesis lemak pada bakteri dan komponen sel lainnya. Gliserol dan asam lemak teroksidasi menghasilkan energi dalam kondisi aerobik (Benson, 2001).

Isolat bakteri asam laktat WK 28 (*Pediococcus* sp.) dan WK 33 (*Lactobacillus* sp.) diidentifikasi memiliki kemampuan dalam menghidrolisis protein dan lemak. Isolat WK 53 (*Streptococcus* sp.) diidentifikasi memiliki kemampuan dalam menghidrolisis protein, amilum, dan lemak. Sehingga dapat digolongkan sebagai kandidat probiotik. Menurut Bairagi *et al.* (2002), kriteria bakteri probiotik antara lain mempunyai aktivitas amilolitik, selulolitik, lipolitik dan proteolitik.

## Kesimpulan dan Saran

Hasil seleksi bakteri asam laktat proteolitik didapatkan tiga isolat yaitu WK 28, WK 33 dan WK 53. Hasil uji biokimia isolat WK 28 termasuk ke dalam genus *Pediococcus* sp., isolat WK 33 termasuk ke dalam *Lactobacillus* sp., dan isolat WK 53 termasuk ke dalam genus *Streptococcus* sp. WK 28 (*Pediococcus* sp.) dan WK 33 (*Lactobacillus* sp.) mempunyai aktivitas proteolitik dan lipolitik. Isolat WK 53 (*Streptococcus* sp.) mempunyai aktivitas enzimatis yaitu aktivitas proteolitik, amilolitik, dan lipolitik. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen, pengujian ketahanan terhadap paparan garam empedu dan beberapa uji lainnya untuk memenuhi kriteria sebagai bakteri kandidat probiotik.

## Daftar Pustaka

- Bairagi, A., K.S. Ghosh, S. K. Sen and A. K. Ray. 2002. Enzyme Producing Bacterial Flora Isolated from Fish Digestive Tracts. *Aquaculture International*, 10 : 109-121.
- Benson. 2001. *Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. Eighth Edition.* McGraw-Hill Science Company : New York. pp. 72-175.
- Chotimah, S.C. 2009. Peranan *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* dalam Proses Pembuatan Yogurt. *Jurnal Ilmu Peternakan*. Vol. 4 (2) : 49.

- Fossi, B.T., F. Tavea, and R. Ndjouenkeu. 2005. Production and Partial Characterization Thermostable Amilase from Ascomycetes Yeast Strain Isolated from Starchy Soils. *African Journal of Biotechnology*, 4 (1) : 14-18.
- Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1988. *Food Microbiology*. Fourth Edition. McGraw-Hill : USA. pp. 11-80.
- Frobisher, M. 1962. *Fundamental of Microbiology*. Seventh Edition. W.B. Saunders : USA. pp. 99-106, 172-177, 248-251.
- Gismondo, M.R., L.Drago and A. Lombardi. 1999. Review of Probiotics Available to Modify Gastrointestinal Flora. *Internasional Journal of Antimicrobial Agents*, 12 : 287-292.
- Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*, 7 (1) : 15-17.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins : USA. pp. 530-566.
- Jusadi, D., E. Gandara dan I. Mokoginta. 2004. Pengaruh Penambahan Probiotik *Bacillus* sp. pada Pakan Komersil terhadap Konversi Pakan dan Pertumbuhan. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 3 (1) : 15-18.
- Khunajakr, N., A. Wongwicham, D. Moonmangmee and S. Tantipaiboonvut. 2008. Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds From Pig Gastrointestinal Tracts. *KMITL Sci. Tech. J.*, 8 (1) : 8-17.
- Lenkey, H.A.W. dan Soeharsono. 2010. Probiotik sebagai Makanan Fungsional. Probiotik. Widya Padjadjaran: Bandung. hal. 66-106.
- Melliawati, R., A.C. Djohan, and Yopi. 2015. Seleksi Bakteri Asam Laktat sebagai Penghasil Enzim Protease. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1 (2) : 184-188.
- Nespolo, C.R. and A. Brandelli. 2010. Production of Bacteriocin-Like Substances by Lactic Acid Bacteria Isolated from Regional Ovine Cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 : 1009-1018.
- Pollack, R.A., L. Findlay, W. Mondschein and R.R. Modesto. 2005. *Laboratory Exercises in Microbiology*. Second Edition. John Wiley and Sons, Inc : New Zaeland. pp. 44-45.
- Rohy, G.S., B.S. Rahardja dan Agustono. 2014. Jumlah Total Bakteri dalam Saluran Pencernaan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) dengan Pemberian Beberapa Pakan Komersial yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 6 (1) : 21-24.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Lee. 1999. Probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10 : 107-110.
- Setyati, W.A. dan Subagiyo. 2012. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler (Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik dan Selulolitik) yang Bersal dari Sedimen Kawasan Mangrove. *Ilmu Kelautan*, 17 (3) : 164-168.
- Sjofjan, O. and T. Ardyati. 2011. Extracellular Amylase Activity of Amyolytic Bacteria Isolated from Quail's (*Coturnix japonica*) Intestinal Tract in Corn Flour Medium. *International Journal of Poultry Science*, 10 (5) : 411-415.

- Sumarsih, S., B. Sulistiyanto, H.S. Adi dan C.S. Utama. 2010. Pengaruh Aras Starter *Lactobacillus* sp. terhadap Performa Mikrobiologi Silase Ikan Dilihat dari Total Bakteri, Bakteri Asam Laktat dan Fungi. *Jurnal Kesehatan*, 3 (1) : 43-50.
- Suryani, Y., Astuti, B. Oktavia dan S. Ummiyati. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Universitas Negeri Yogyakarta. hal. 138-147.
- Svetlitschnyl, V., F. Rainey, and J. Wiegel. 1996. *Thermosyntropha Lipolytica* Grn. Nov., sp. Nov., a Lipolytic, Anaerobic, Alkalitolerant, Thermophilic Bacterium Utilizing Short and Long Chain Fatty Acid in Syntrophic Coculture with a Methanogenic Archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 1131-1137.
- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari *Coco Butter-Substitute* dan Karakterisasi Lipasenya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*. 10 hal.
- Triyanto, A. Isnansetyo, I.D. Prijambada, J. Widada dan A. Tarmiawati. 2009. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Infeksi Bakteri Proteolitik dari Lumpur Kawasan Hutan Bakau. *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci)*, 11 (1): 13-18.
- Wilson, P. and Z. Remigio. 2012. Production and Characterisation of Protease Enzyme Produced by a Novel Moderate Thermophilic Bacterium (EP-1001) Isolated from an Alkaline Hot Spring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (27) : 5542-5551.
- Yelnetty, A., H. Purnomo, Purwadi, A. Mirah. 2014. Biochemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria with Proteolytic Activity and Capability as Starter Culture Isolated from Spontaneous Fermented Local Goat Milk. *Journal of Natural Sciences Research*, 4 (10) : 137-146.
- Yusmarini, R. Indrati, T. Utami dan Y. Marsono. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia*, 12 (1) : 28-33.