

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var. Sims)

Fermentasi markisa ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) merupakan fermentasi secara alami yang dilakukan tanpa menambahkan mikroba dari luar (starter) dan terjadi dengan sendirinya dengan bantuan mikroflora indigen. Carl (1971) mengatakan bahwa karakteristik dari proses ini adalah adanya bakteri asam laktat yang termasuk bakteri heterofermentatif. Hasil pertumbuhan bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol, manitol, dekstran, ester dan CO₂. Kombinasi dari asam, alkohol dan ester ini akan menghasilkan rasa yang spesifik dan disukai.

Secara sederhana, proses biokimia fermentasi dapat dijelaskan bahwa hasil fermentasi diperoleh sebagai akibat metabolisme mikroba pada suatu bahan pangan dalam keadaan anaerob. Mikroba yang melakukan fermentasi membutuhkan energi yang umumnya diperoleh dari glukosa. Dalam keadaan anaerob, mikroba ini mengubah glukosa menjadi air, CO₂ dan energi (ATP) yang digunakan untuk pertumbuhan. Beberapa mikroba hanya dapat melangsungkan metabolisme dalam keadaan anaerob dan hasilnya adalah substrat setengah terurai (Muchtadi, 2010).

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juli 2014, didapatkan 3 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari buah markisa ungu yang telah difermentasi. Tujuan dari fermentasi buah markisa ungu dalam penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri asam laktat yang diduga

sebagai penghasil EPS. Amalia (2012) dalam penelitiannya telah berhasil mengeksplorasi isolat BAL asal sawi asin sebagai penghasil EPS. Halim (2013) menguji potensi probiotik dari isolat BAL penghasil eksopolisakarida tinggi asal sawi asin.

Sumber nutrisi bagi bakteri asam laktat adalah karbohidrat seperti gula-gula sederhana yang terdapat di dalam markisa ungu, yang selanjutnya diubah menjadi asam laktat. Kondisi anaerobik pada proses fermentasi ini mutlak diperlukan agar fermentasi dapat berjalan dengan baik. Mikroorganisme tersebut yang kemudian memicu terjadinya fermentasi alami pada buah ini. Kehadiran protein dalam buah markisa juga dapat menyokong pertumbuhan mikroflora-mikroflora alami ini terutama bakteri asam laktat yang memerlukan sejumlah protein dalam pertumbuhannya. Menurut Buckle (1987), fermentasi asam laktat terjadi karena adanya aktivitas bakteri laktat yang mengubah glukosa menjadi asam laktat, sehingga jumlah bakteri asam laktat meningkat selama proses fermentasi berlangsung yang akan diikuti dengan penurunan pH.

Asam-asam organik dari produk fermentasi merupakan hidrolisis asam lemak dan juga sebagai hasil aktivitas pertumbuhan bakteri. Penentuan kuantitatif asam organik pada proses fermentasi ini penting untuk mempelajari kontribusi bagi aroma sebagian besar produk fermentasi, alasan gizi dan sebagai indikator aktivitas bakteri (Bavilacqua dan Calivano, 1989).

Allah SWT telah berfirman dalam al-Qur'an surat Adz-Dzariyaat ayat 20:

وَفِي الْأَرْضِ آيَاتٌ لِّلْمُوقِنِينَ ﴿٢٠﴾

“Dan di bumi itu terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang yakin.” (QS. Adz-Dzariyaat [51]: 20).

Ayat di atas menunjukkan bahwa dalam segala sesuatu yang telah diciptakan Allah SWT serta kejadian-kejadian yang terjadi di dalamnya, terdapat kekuasaan-kekuasaan Allah yang lain, yang dapat dilihat dan diteliti bagi orang-orang yang yakin. Seperti adanya Bakteri asam laktat (BAL) yang dihasilkan dari buah markisa asam yang telah didiamkan, yang dalam hal ini telah mengalami proses fermentasi, karena Bakteri Asam Laktat (BAL) diantaranya bisa didapatkan dari buah yang telah difermentasi (Sari, 2013). Bakteri ini dapat memproduksi asam laktat, asam asetat, etanol, dan juga karbondioksida (CO₂). Aktifitas dari bakteri ini dapat menyebabkan penurunan pH dimana bakteri patogen tidak dapat tumbuh pada pH yang rendah sehingga dapat meningkatkan nilai sehat terhadap makanan atau minuman yang difermentasi (Hidayat, 2006). Selain itu, saat ini BAL digunakan untuk pengawetan, memberikan tekstur, dan menambah cita rasa makanan atau minuman (Noordiana, 2013).

Bakteri asam laktat diisolasi untuk menghasilkan antimikroba yang dapat digunakan sebagai probiotik. Manfaat bagi kesehatan diantaranya memperbaiki daya cerna laktosa, mengendalikan bakteri patogen dalam saluran pencernaan, penurunan serum kolesterol, menghambat tumor, kanker, antimutagenik dan antikarsinogenik. Konsumsi probiotik dapat menimbulkan efek terapeutik pada tubuh dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan (Fuller, 1989).

Selain itu, Savadogo (2004) mengatakan bahwa BAL dalam industri makanan memiliki reputasi aman untuk mengontrol patogen pada makanan, karena BAL memproduksi berbagai komponen antimikroba seperti asam organik,

diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin atau protein bakterisidal selama fermentasi laktat.

4.2 Identifikasi Makroskopik

Identifikasi secara makroskopik dilakukan untuk mengetahui bentuk koloni, warna koloni dan bentuk permukaan koloni, yang dilakukan dengan cara memilih strain isolat yang berbeda setelah proses isolasi tahap pertama. Koloni yang diduga BAL berwarna putih hingga putih kekuningan, berbentuk bulat dengan tepian berwarna bening. Koloni bakteri asam laktat ditemukan berdasarkan perubahan warna media menjadi kuning muda (atau putih susu) di sekitar lokasi tumbuh koloni bakteri. Isolat bakteri asam laktat yang memiliki koloni yang sama dianggap sebagai 1 jenis (strain).

Adapun hasil dari identifikasi makroskopik disajikan dalam tabel 4.1 di bawah ini:

Tabel 4.1 Hasil Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) Secara Makroskopik

Isolat	Bentuk Koloni	Warna	Tepian	Elevasi
T1	Sirkuler	Kekuningan	Enpitire	Umbonate
T2	Sirkuler	Putih susu	Enpitire	Convex
T3	Sirkuler	Putih susu	Enpitire	Convex

Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 4.1 di atas, dapat diketahui bahwa terdapat bakteri dalam buah markisa ungu yang telah difermentasi. Hasil pengamatan secara makroskopik menunjukkan bahwa keseluruhan isolat yang diperoleh memiliki bentuk koloni bulat dengan warna putih hingga putih kekuningan, yang diduga merupakan kelompok bakteri asam laktat. Tepian koloni dari ketiga isolat berbentuk enpitire atau rata dengan elevasi koloni dari isolat T1 umbonate, yaitu berbentuk cembung namun bagian tengah lebih menonjol,

sedangkan isolat T2 dan T3 permukaannya convex, yaitu berbentuk cembung seperti tetesan air, sehingga diduga bentuk permukaan koloni yang berbeda inilah yang menyebabkan berbedanya warna koloni saat diamati secara langsung. Bentuk koloni dari isolat T1 menyebar dan bergerombol, sedangkan bentuk koloni dari isolat T2 dan T3 menyebar serta memiliki diameter koloni yang lebih kecil.

Dwidjoseputro (2005) mengatakan bahwa pengamatan makroskopis morfologi koloni meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri. Menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994), bakteri merupakan kelompok prokariotik karena belum memiliki organel-organel sel yang kompleks, sehingga terdapat perbedaan struktur pada dinding sel bakteri. Oleh sebab itu ada 4 kategori umum bakteri yang perlu diketahui, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang mempunyai dinding sel, bakteri berdinding sel tidak sempurna dan *archaeobacteria*.

Identifikasi makroskopik pada isolat (strain) bakteri asam laktat yang berbeda kemudian dilanjutkan dengan identifikasi mikroskopik meliputi pewarnaan gram, uji katalase dan pewarnaan endospora, yang kemudian diisolasi dalam bentuk starter BAL penghasil eksopolisakarida kasar.

4.3 Identifikasi Mikroskopik

Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan gram dan endospora serta uji katalase. Kisaran temperatur pertumbuhan untuk bakteri asam laktat biasanya 15° C - 45° C. Sedangkan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri asam laktat pada suhu 30° C - 37° C (Barrow, 1993). Hasil identifikasi

mikroskopik isolat BAL asal fermentasi markisa ungu tertera pada tabel 4.2 di bawah ini.

Tabel 4.2 Hasil Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) Secara Mikroskopik

Isolat	Bentuk Sel	Jenis Gram	Katalase	Endospora
T1	Basil	+	-	-
T2	Basil	+	-	-
T3	Basil	+	-	-

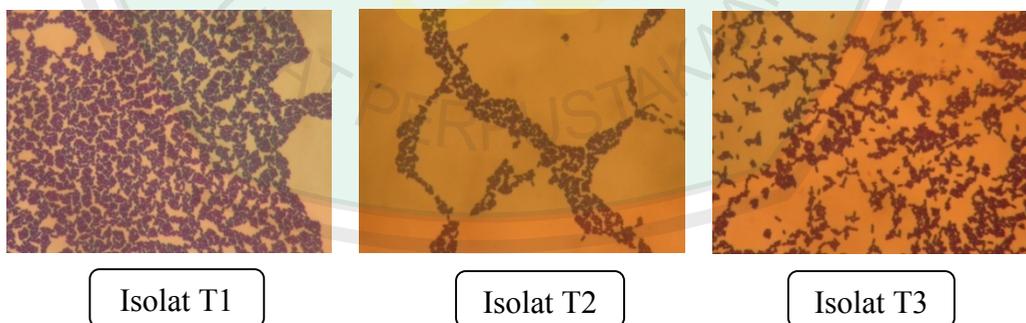
Hasil fermentasi bergantung pada jenis bahan pangan (substrat), jenis mikroba dan kondisi di sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroba tersebut. BAL merupakan kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Genus bakteri yang tumbuh selama masa fermentasi berbeda. Berdasarkan hasil pewarnaan gram, uji katalase dan pewarnaan endospora, maka dapat dipastikan bahwa ketiga isolat adalah kelompok bakteri asam laktat.

4.3.1 Pewarnaan Gram dan Endospora

Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui jenis gram dari isolat bakteri, yang merupakan penentuan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri gram positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Menurut Brooks *et al.*, (2005), bakteri gram positif memiliki unsur khusus, yaitu teichoic sebanyak 50% dari berat kering dinding sel. Unsur ini memiliki fungsi untuk menjaga transportasi ion, integritas dinding sel dan lainnya sehingga resisten terhadap autolisis dan menjaga permeabilitas eksternal. Kemampuan tersebutlah yang menjadi dasar dipilihnya bakteri gram positif sebagai probiotik karena secara morfologi dan biokimia lebih mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan.

Hasil pewarnaan gram pada ketiga isolat bakteri asal fermentasi markisa ungu adalah positif, yaitu sel bakteri berwarna ungu setelah dilakukan pengecatan gram (gambar 4.1). Hal tersebut dikarenakan bakteri ini memiliki kandungan lipid yang lebih rendah, sehingga dinding sel bakteri akan lebih mudah terdehidrasi akibat perlakuan dengan alkohol yang menyebabkan ukuran pori-pori sel menjadi lebih kecil dan daya permeabilitasnya berkurang sehingga zat warna kristal violet yang merupakan zat warna utama tidak dapat keluar dari sel (Pelczar, 1986).

Hasil uji pewarnaan gram terhadap isolat dari markisa ungu yang telah difermentasikan menghasilkan beberapa isolat yang memiliki bentuk morfologi sel batang dengan susunan berantai, dan diduga isolat ini merupakan genus *Lactobacillus*. Menurut Sneath (1980), berdasarkan Bergeys's *Manual of Systemic Bacteriology*, kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang yang mempunyai katalase negatif dan hasil pengecatan gram bersifat positif merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*.



Gambar 4.1 Hasil identifikasi mikroskopik isolat bakteri asam laktat asal fermentasi buah markisa ungu (*Passiflora edulis* var. Sims)

Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif, sehingga metabolismenya bersifat inaktif dan mampu bertahan dalam tekanan fisik dan kimia seperti panas, kering, dingin, radiasi dan bahan kimia. Tujuan dilakukannya

pewarnaan endospora adalah membedakan endospora dengan sel vegetatif, sehingga pembedaannya tampak jelas (Itis, 2008).

Tahap pewarnaan endospora juga dilakukan pada isolat ini meskipun sebenarnya pada pengamatan pewarnaan gram dapat dilihat bentuk sel bakteri dari isolat yang telah diisolasi. Dari pengamatan tersebut dapat dilihat bahwa tidak ada ruang kosong dari sel bakteri yang tidak terwarnai pewarnaan gram, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat spora pada sel bakteri dari isolat bakteri asal fermentasi markisa ungu. Menurut Itis (2008), endospora tetap dapat dilihat di bawah mikroskop meskipun tanpa pewarnaan dan tampak sebagai bulatan transparan dan sangat refraktil. Namun jika dengan pewarnaan sederhana, endospora sulit dibedakan dengan badan inklusi (kedua-duanya transparan, sel vegetatif berwarna), sehingga perlu dilakukan teknik pewarnaan endospora.



Gambar 4.2 Hasil Pewarnaan Endospora

Spora yang dihasilkan oleh bakteri pada pewarnaan endospora akan menyerap pewarna *malachite green*, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah dikarenakan pewarnaan safranin. Pada pengamatan diketahui bahwa tidak ditemukan endospora pada sel isolat bakteri hasil isolasi dari fermentasi Markisa

Ungu, karena yang terlihat hanyalah sel vegetatif yang berwarna merah karena pewarna safranin yang telah diberikan.

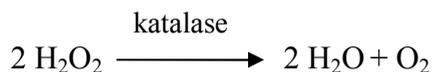
Berdasarkan pewarnaan gram serta endospora yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa ciri-ciri tersebut merupakan ciri-ciri dari bakteri asam laktat, yaitu gram positif dengan bentuk sel basil serta endospora negatif yang terlihat dengan tidak adanya spora pada bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa jenis bakteri tersebut adalah jenis bakteri asam laktat. Hal tersebut sesuai dengan literatur milik Salminen (1998), Yousef (2003) serta Rustan (2013) yang mengatakan bahwa mikroba yang melakukan fermentasi pada produk fermentasi sayuran adalah dari jenis bakteri penghasil asam laktat.

Schlegel dan Schmidt (1994) juga menyatakan bahwa bakteri asam laktat adalah bakteri-bakteri gram positif dan bukan pembentuk spora yang dapat tumbuh di lingkungan oksigen dan pada peragian karbohidrat (glukosa dan laktosa) terutama membentuk asam laktat. Termasuk dalam bakteri asam laktat ini adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* dan *Bifidobacterium*.

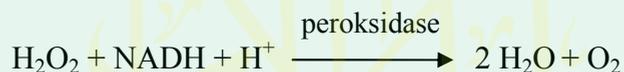
4.3.2 Uji Katalase

Setelah pewarnaan gram serta endospora, dilakukan uji katalase pada isolat bakteri yang termasuk dalam bakteri gram positif. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Raharjo (2012) mengatakan bahwa enzim katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalis langsung konversi hidrogen

peroksida (H_2O_2) yang toksik bagi sel menjadi air dan oksigen. Reaksi kimia yang dihasilkan oleh katalisasi enzim katalase terhadap H_2O_2 adalah:



Menurut Raharjo (2012), bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* merupakan kelompok bakteri yang tidak memiliki enzim katalase, tetapi memiliki enzim peroksidase untuk mengubah H_2O_2 yang bersifat toksik menjadi H_2O . Tidak seperti enzim katalase yang secara langsung mengkatalisasi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , enzim peroksidase membutuhkan reduktan seperti NADH untuk mengkatalisasi H_2O_2 menjadi H_2O . Berikut reaksi kimia yang dihasilkan oleh katalisasi enzim peroksidase terhadap H_2O_2 (Brooks, 2005):



Uji katalase ini dilakukan dengan meneteskan 1-2 tetes H_2O_2 3% pada isolat BAL yang telah diinkubasi selama 24 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung pada isolat yang menunjukkan terbentuknya oksigen sebagai hasil dari pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase yang diproduksi bakteri tersebut. Hasil uji katalase pada ketiga isolat bakteri menunjukkan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung gas yang berisi oksigen ketika isolat ditetesi dengan larutan H_2O_2 . Hal ini sesuai dengan penelitian Stamer (1979) yang mengatakan bahwa bakteri asam laktat termasuk bakteri dengan katalase negatif. Yousef (2003) mengatakan bahwa telah umum diketahui bahwa bakteri asam laktat memiliki sifat anaerob tetapi mampu mentoleransi adanya oksigen dan memetabolisme karbohidrat melalui jalur fermentasi.

4.4 Genus *Lactobacillus*

Identifikasi tingkat genus dapat diketahui dengan melihat bentuk sel serta susunan dari isolat bakteri yang ditemukan. Ketiga isolat dalam penelitian ini memiliki bentuk sel batang dengan susunan berantai, merupakan jenis gram positif, katalase negatif dan tidak memiliki spora. Sehingga diduga termasuk dalam genus *Lactobacillus*. Holt *et al.*, (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* mengatakan bahwa bakteri dalam genus *Lactobacillus* termasuk bakteri gram positif, tidak berspora, tidak motil, fakultatif anaerob, kadang-kadang mikroaerofilik, sedikit tumbuh di udara tapi bagus dalam keadaan di bawah tekanan oksigen rendah, dan beberapa anaerob pada isolasi. Dan genus yang ditemukan dalam fermentasi buah markisa ungu (*Passiflora edulis* var. Sims) ini adalah *Lactobacillus*. Ray (2001) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri yaitu selnya berbentuk batang dengan ukuran dan bentuk yang sangat seragam, beberapa bisa sangat panjang dan beberapa lainnya bersifat batang bulat. Munculnya pada bentuk sel tunggal atau pada rantai yang pendek sampai panjang, anaerob fakultatif, gram positif dan sebagian ada yang gram negatif, kebanyakan spesies tidak bergerak dan mesofilik.

Stamer (1979) juga mengatakan bahwa *Lactobacillus* ada yang homofermentatif dan heterofermentatif. Kurang dari separuh produk akhir karbon adalah laktat, tidak menghasilkan nitrat, gelatin tidak menjadi cair, sitokrom negatif, katalase negatif dan oksidase positif. Bakteri pada genera ini tumbuh optimum pada suhu 30-40° C. *Lactobacillus* tersebar luas di lingkungan, terutama pada hewan dan produk makanan sayur-sayuran serta tidak bersifat patogen.

Bakteri *Lactobacillus* memiliki habitat asli membran mukosa dari hewan atau manusia, tanaman, limbah, makanan terfermentasi misalnya susu asam, adonan yang asam dan lain sebagainya.

Nutrisi yang dibutuhkan oleh *Lactobacillus* adalah asam amino, peptida, derivat asam nukleat, vitamin, garam, asam lemak atau ester asam lemak dan karbohidrat yang terfermentasi (Sneath *et al*, 1986). *Lactobacillus* menghasilkan produk akhir asam organik dari metabolisme karbohidrat, sehingga genera ini dapat mentolerir nilai pH yang lebih kecil dari banyak bakteri. Hal ini dapat diketahui dari pH buah markisa ungu yang berkisar sekitar 3-4. Rustan (2013) dalam penelitiannya mengatakan, bahwa *Lactobacillus* aktif saat bakteri yang telah aktif sebelumnya memproduksi asam laktat yang tinggi, seperti bakteri-bakteri dari genera *Leuconostoc* dan *Streptococcus*.

Menurut Septiadi (2000), pada pembuatan sayur asin terdapat 3 macam mikroba yang akan mengubah gula dari sayuran menjadi asam asetat, asam laktat dan hasil-hasil lainnya. Bakteri dari genera *Lactobacillus* akan aktif pada suhu di atas 21° C di mana bakteri asam laktat akan memproduksi banyak asam laktat sehingga *Lactobacillus* yang aktif.

4.5 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat Sampai Tingkat Spesies Menggunakan *Microbact 12*

Hasil identifikasi mikroskopik pada isolat BAL asal fermentasi markisa ungu menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki bentuk sel basil, katalase negatif dan endospora negatif. Sehingga diduga isolat-isolat tersebut termasuk dalam genera *Lactobacillus*. Selanjutnya akan dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies menggunakan *Kit Microbact 12* yang melibatkan beberapa fermentasi

gula-gula seperti Glukosa, Xylosa, Laktosa, Sukrosa, Maltosa, dan Arabinosa. Identifikasi sampai tingkat spesies juga melibatkan pengujian yang lain, diantaranya uji BGP, uji pertumbuhan pada suhu (25° C, 37° C, 40° C dan 45 °C), uji NaCl (3%, 4%, 6,5% dan 10%), uji pertumbuhan pada media (NB, MCA, TSI, Citrat, Indol, MR dan VP) serta uji karakteristik (Motilitas, Oksidase, Proteolitik, Amilolitik dan Lipolitik). Evaluasi hasil identifikasi dapat dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Nama spesies bakteri dilihat dengan *Microbact software* berdasarkan angka oktal yang didapat.

Segala ciptaan Allah SWT di muka bumi ini pasti memiliki petunjuk, ilmu maupun manfaat tersendiri dan kewajiban manusia sebagai Ulul Albab untuk mempelajari dan meyakinkannya. Sehingga manusia dapat memikirkan dan mengambil pelajaran serta ilmu pengetahuan yang tersimpan di dalamnya. Sebagaimana Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* telah berfirman dalam al-Qur'an surat Âli Imron ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka" (QS. Âli Imron [3]: 191).

Maksud dari ayat pada surat Âli Imron ini adalah bahwa segala makhluk Allah SWT di alam semesta ini tidak ada yang sia-sia “مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا”, bagi orang-orang yang mengingat Allah dan memikirkan ciptaanNya, baik bagi hewan

maupun tumbuhan meskipun dalam ukurannya yang sangat kecil sekalipun. Mikroorganisme inipun banyak memberikan perannya dalam kehidupan sehari-hari, diantaranya adalah sebagai pengurai bahan organik. Namun, karena ukurannya yang sangat kecil ini, ia bisa masuk ke dalam tubuh dengan sangat mudah, pun sifatnya ada yang merugikan dan ada pula yang menguntungkan. Salah satu contohnya adalah adanya bakteri asam laktat yang dapat dihasilkan oleh fermentasi buah maupun sayur yang dapat bersifat probiotik, yakni baik untuk kesehatan tubuh.

Produk makanan probiotik yang telah lama dikenal antara lain produk susu fermentasi oleh bakteri asam laktat (*Lactobacilli* dan *Bifidobacterium*) seperti yoghurt, yakult, susu *Acidofilus* dan lain-lain. Mikroorganisme probiotik yang digunakan secara oral lebih tahan terhadap enzim dalam mulut (amylase, lisozim) terhadap enzim pepsin atau lipase dan pH rendah (konsentrasi HCl tinggi) pada lambung, konsentrasi asam empedu, getah pankreas dan mucus pada usus halus (Ernawati, 2010).

Ngatirah (2000) mengatakan bahwa beberapa strain BAL berpotensi sebagai probiotik karena kemampuannya untuk menghambat bakteri patogen. Rustan (2013) juga mengatakan bahwa sebagian bakteri asam laktat berpotensi memberikan dampak positif bagi kesehatan dan nutrisi manusia, diantaranya adalah meningkatkan nilai nutrisi makanan, mengontrol infeksi pada usus, meningkatkan digesti laktosa, mengendalikan beberapa tipe kanker dan mengendalikan tingkat serum kolesterol dalam darah. Probiotik umumnya terdiri dari satu atau beberapa BAL, misalnya *Lactobacillus* dan *Streptococcus*.

Keduanya seringkali digunakan sebagai probiotik karena merupakan mikroorganisme asli dalam ekosistem saluran pencernaan dan telah banyak dilaporkan memiliki sifat antagonis terhadap bakteri-bakteri patogen di dalam usus.

4.5.1 *Lactobacillus heterohiochii*

Hasil identifikasi dari isolat T1 ini menunjukkan hasil positif pada uji BGP. Pada fermentasi gula-gula yang dihasilkan nilai positif adalah fermentasi fruktosa dan glukosa, sedangkan pada fermentasi gula-gula yang lain seperti pada laktosa, maltosa, arabinosa dan lainnya memiliki hasil yang negatif (Lampiran 4). Pada uji NaCl 3%, 4%, 6,5% dan 10% memiliki hasil positif yang menunjukkan bahwa isolat ini mampu tumbuh pada NaCl. Uji pertumbuhan isolat bakteri pada media-media *Nutrient Broth*, MCA, TSI, Citrat, Indol, MR dan VP menunjukkan hasil negatif, yang artinya isolat ini tidak dapat tumbuh dalam media-media tersebut. Pada suhu pertumbuhan 25° C, 37° C isolat ini dapat tumbuh, sedangkan pada suhu 40° C dan 45 °C isolat ini tidak dapat tumbuh. Sedangkan pada uji karakteristik menunjukkan hasil positif pada uji motilitas, proteolitik, amilolitik dan hasil negatif pada uji katalase, oksidase dan lipolitik. Berdasarkan hasil dari beberapa uji yang telah dilakukan didapatkan identifikasi isolat tersebut sebagai *Lactobacillus heterohiochi*.

Tabel 4.3 Hasil Uji Biokimia Isolat T1

Jenis Tes	Hasil Tes
BGP	Positif
SPORA	Negatif
Fermentasi Gula-Gula	
Arabinosa	Negatif
Fruktosa	Positif
Glukosa	Positif

Lanjutan Tabel 4.3

Jenis Tes	Hasil Tes
Laktosa	Negatif
Maltosa	Negatif
Mannitol	Negatif
Raffinosa	Negatif
Rhamnosa	Negatif
Salicin	Negatif
Sorbitol	Negatif
Sukrosa	Negatif
Xylosa	Negatif
Suhu Pertumbuhan	
25° C	Positif
37° C	Positif
40° C	Negatif
45° C	Negatif
Uji NaCl	
3%	Positif
4%	Positif
6,5%	Positif
10%	Positif
Uji Karakteristik	
Katalase	Negatif
Motilitas	Positif
Oksidase	Negatif
Proteolitik	Positif
Amilolitik	Positif
Lipolitik	Negatif
Media Pertumbuhan	
Nutrient Broth	Negatif
MCA	Negatif
TSI	A/A, H ₂ S-, G-
CITRAT	Negatif
INDOL	Negatif
MR	Negatif
VP	Negatif
DX. Laboratorium	<i>L. heterohiochii</i>

Lactobacillus heterohiochii, atau yang biasa dikenal dengan *Lactobacillus fructivorans* merupakan bakteri asam laktat berbentuk batang. Bakteri ini dapat ditemukan dalam bentuk tunggal, berpasangan, rantai panjang atau filamen yang melengkung panjang, tumbuh optimum pada suhu 30° C sampai 40° C, heterofermentatif obligat, dapat membentuk gas dari glukosa dan glukonat (Dicks

dan Endo, 2009). *Lactobacillus fructivorans* merupakan bakteri non-motil dengan produk utama pada akhir proses metabolisme adalah laktat, meskipun etanol, asetat, format, CO₂ dan suksinat juga dapat diproduksi (Nam *et al.*, 2012).

Kandler (1983) dalam penelitiannya mengatakan bahwa strain bakteri jenis *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus heterohiochii* dan *Lactobacillus trichodes* menunjukkan homologi yang tinggi pada susunan DNA-DNANYa dengan sedikit pengecualian karakteristik fenotipik yang identik. Ketiga jenis strain bakteri ini sering dikenal dengan nama *Lactobacillus fructivorans*.

Klasifikasi *Lactobacillus heterohiochii* adalah sebagai berikut:

Kingdom Bacteria

Divisi Firmicutes

Kelas Bacilli

Ordo Lactobacillales

Famili Lactobacillaceae

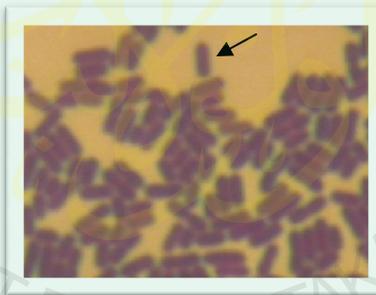
Genus *Lactobacillus*

Spesies *Lactobacillus heterohiochii* / *L. fructivorans*

Lactobacillus heterohiochi sering ditemukan dalam produk-produk fermentasi khas Jepang, seperti “sake” dan “kimchi” atau pada “*dressing salad*”. Dicks dan Endo (2009) dalam penelitiannya mengatakan bahwa *Lactobacillus fructivorans* merupakan anggota dari genus *Lactobacillaceae* yang sering ditemukan dalam anggur, bir, susu, asinan sayur, daging dan ikan. *Lactobacillus fructivorans* juga ditemukan pada buah pisang (*Musa paradisiaca formatypica*) yang difermentasi spontan dalam aquades steril dengan menggunakan erlenmeyer dan ditutup secara aseptis (Nurhayati, 2011). *Lactobacillus fructivorans* juga ditemukan dalam saus tomat (Bjorkroth, 1997). Bahkan, spesies ini juga telah

diisolasi dari usus ikan dan lalat buah *Drosophila melanogaster* (Picchietti *et al*, 2007;. Ren *et al*, 2007;. Wong *et al*, 2011).

Bakteri memiliki beberapa sifat metabolisme yang memungkinkan mereka untuk berfungsi sebagai kultur starter dalam produksi susu, daging, dan produk nabati fermentasi dan minuman. Bakteri *Lactobacillus fructivorans* terutama bertanggung jawab untuk proses metabolisme yang menghasilkan asam laktat. Setelah mikroba memetabolisme gula menjadi asam laktat, makanan dan minuman mengembangkan rasa asam yang merupakan karakteristik dari makanan dan minuman fermentasi. Oleh karena itu, banyak rasa dan proses pematangan dalam makanan fermentasi yang berhubungan dengan *Lactobacillus fructivorans* dan anggota lain dari genus *Lactobacillus* (Nam *et al*, 2012).



Gambar 4.3 *Lactobacillus heterohiochii*

Meskipun ada beberapa jenis *Lactobacillus* yang mampu mengkonversi gula menjadi asam laktat dan karbondioksida, umumnya mereka tidak dapat bertahan hidup dalam fermentasi alkohol dan akan mati dalam jenis lingkungan tersebut. *Lactobacillus fructivorans* adalah salah satu dari beberapa spesies yang berhasil bertahan pada fermentasi alkohol dan benar-benar akan terus berkembang dan terlibat dalam multiplikasi sel setelah itu (Dicks dan Endo, 2009). Oleh karena itu bakteri ini memainkan peran penting dalam produksi minuman fermentasi seperti

anggur dan bir. Makanan fermentasi lain dimana *Lactobacillus fructivorans* ditemukan berperan dalam proses fermentasi dan pematangan termasuk yogurt, keju, kimchi, acar sayuran dan asinan kubis. Selain itu, mikroba ini sering ditemukan dalam daging dan produk ikan. Ljungh dan Wadstrom (2009) mengatakan bahwa *Lactobacillus fructivorans* adalah BAL heterofermentif yang umumnya terkait dengan pembusukan makanan.

Bakteri ini dapat tumbuh di minuman fermentasi alkohol karena bakteri ini memiliki ketahanan hidup terhadap konsentrasi etanol yang tinggi. Kanauchi (2014) menyatakan bahwa ia dapat hidup pada konsentrasi etanol yang lebih tinggi dari 18% di “sake”. Tamura (2004) dalam penelitiannya menemukan bahwa koefisien untuk pertumbuhan bakteri ini dapat tumbuh dalam produk fermentasi alkohol adalah asam mevalonat, atau biasa disebut dengan asam hiochi. Sebelum itu, Barnes (1961) mengatakan bahwa *Lactobacillus heterohiochii* gagal tumbuh pada medium yang mengandung asam mevalonat (khas untuk bakteri asam laktat) kecuali konsentrasi asam mevalonat tersebut ditingkatkan hingga 10 kali lipat dan ekstrak ragi ditambahkan, atau diganti dengan enzim yang dapat mencerna kasein.

4.5.2 *Lactobacillus bulgaricus*

Hasil identifikasi dari isolat T2 dan T3 menunjukkan hasil yang sama pada semua pengujian yang dilakukan. Hasil positif didapatkan pada uji BGP. Pada fermentasi gula-gula nilai positif yang dihasilkan adalah pada fermentasi fruktosa, laktosa dan glukosa, sedangkan pada fermentasi gula-gula yang lain seperti pada maltosa, arabinosa dan lainnya memiliki hasil yang negatif (Lampiran 4). Pada uji NaCl 3%, 4%, 6,5% dan 10% memiliki hasil positif yang menunjukkan bahwa

isolat ini mampu tumbuh pada NaCl. Uji pertumbuhan isolat bakteri pada media-media *Nutrient Broth*, MCA, TSI, Citrat, Indol, MR dan VP menunjukkan hasil negatif, yang artinya isolat ini tidak dapat tumbuh dalam media-media tersebut. Pada suhu pertumbuhan 25° C, 37° C isolat ini dapat tumbuh, sedangkan pada suhu 40° C dan 45 °C isolat ini tidak dapat tumbuh. Pada uji karakteristik menunjukkan hasil positif pada uji motilitas, proteolitik, amilolitik dan hasil negatif pada uji katalase, oksidase dan lipolitik. Berdasarkan hasil dari beberapa uji yang telah dilakukan didapatkan identifikasi isolat tersebut sebagai *Lactobacillus bulgaricus*.

Tabel 4.4 Hasil Uji Biokimia Isolat T2 dan T3

Jenis Tes	Hasil Tes
BGP	Positif
SPORA	Negatif
Fermentasi Gula-Gula	
Arabinosa	Negatif
Fruktosa	Positif
Glukosa	Positif
Laktosa	Positif
Maltosa	Negatif
Mannitol	Negatif
Raffinosa	Negatif
Rhamnosa	Negatif
Salicin	Negatif
Sorbitol	Negatif
Sukrosa	Negatif
Xylosa	Negatif
Suhu Pertumbuhan	
25 ⁰ C	Positif
37 ⁰ C	Positif
40 ⁰ C	Negatif
45 ⁰ C	Negatif
Uji NaCl	
3%	Positif
4%	Positif
6,5%	Positif
10%	Positif

Lanjutan Tabel 4.4

Jenis Tes	Hasil Tes
Uji Karakteristik	
Katalase	Negatif
Motilitas	Positif
Oksidase	Negatif
Proteolitik	Positif
Amilolitik	Positif
Lipolitik	Negatif
Media Pertumbuhan	
Nutrient Broth	Negatif
MCA	Negatif
TSI	A/A, H ₂ S-, G-
CITRAT	Negatif
INDOL	Negatif
MR	Negatif
VP	Negatif
DX. Laboratorium	<i>L. bulgaricus</i>

Lactobacillus bulgaricus termasuk bakteri gram positif berbentuk batang dan tidak membentuk endospora, bersifat homofermentatif (menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi), mikroaerofilik, tidak mencerna kasein, tidak memproduksi indol dan H₂S, tidak memproduksi enzim katalase dan tidak patogen (Sneath *et al.*, 1986), membutuhkan nutrisi yang lengkap untuk pertumbuhannya, dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya sekitar 37° C. Kondisi optimum untuk pertumbuhannya adalah sedikit asam atau sekitar pH 5,5 dan pertumbuhannya dapat terhenti pada pH 3,5-3,8 (Tamime dan Robinson, 1999).

Lactobacillus bulgaricus biasanya menjadi salah satu bakteri yang digunakan sebagai kultur starter dalam pembuatan yoghurt. Bakteri ini tidak dapat hidup dalam usus namun hanya bertahan selama sekitar tiga jam setelah masuk ke dalam usus bersama dengan yoghurt yang diminum (Yoguchi, 1992). Bakteri ini

memiliki sifat reduksi litmus yang kuat, tidak tahan garam (6,5%) dan bersifat termodurik (Rahman, 1992). Bakteri termodurik tumbuh baik pada suhu 20-37°C dengan suhu pertumbuhan minimum pada suhu 5-10°C seperti *Streptococcus* dan *Lactobacillus* (Buckle, 1987). Berdasarkan kebutuhannya terhadap oksigen, bakteri ini tergolong anaerob fakultatif, yang dapat tumbuh dengan adanya oksigen dan tetap dapat tumbuh secara anaerob apabila oksigen tidak tersedia.

Adapun klasifikasi dari *Lactobacillus bulgaricus* adalah sebagai berikut (Irianto, 2006):

Kingdom Bacteria

Divisi Firmicutes

Kelas Bacilli

Ordo Lactobacillales

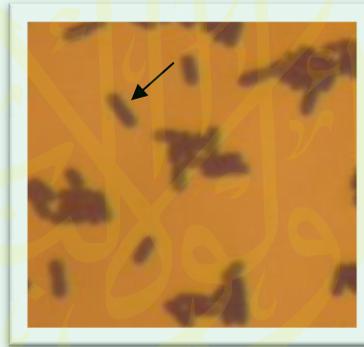
Famili Lactobacillaceae

Genus *Lactobacillus*

Spesies *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus secara luas digunakan dalam produksi produk susu fermentasi seperti yoghurt, keju dan krim disebabkan sifat-sifatnya yang menguntungkan secara teknologi, nutrisi dan khususnya terhadap kesehatan (Stanson *et al.*, 2001). Selain ditemukan pada buah markisa ungu terfermentasi, Sneath (1986) mengatakan bahwa *L. bulgaricus* sering ditemukan pada produk susu, daging dan ikan, air limbah, bir, anggur, buah-buahan, jus buah-buahan, sayuran fermentasi, acar, silase, adonan roti asam, dan bubur. Bakteri ini juga merupakan bagian normal flora pada mulut, traktus intestinal dan vagina hewan homothermik termasuk manusia.

Lactobacillus bulgaricus berperan dalam menghasilkan rasa khas dan tajam. *Lactobacillus* juga menghasilkan metabolit-metabolit yang menjadi sumber dan cita rasa yang spesifik dan substansi-substansi yang bersifat menghambat terhadap pertumbuhan mikroba yang tidak sesuai. Produk metabolik utama dari bakteri ini adalah asam laktat dan komponen aroma seperti asetildehid dan diasetil (Ray, 2003). *Lactobacillus bulgaricus* menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) dan senyawa penghambat yang disebut bulgarikan. Keberadaannya dapat mengawetkan produk dengan menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan serta meningkatkan keamanan produk pangan.



Gambar 4.4 *Lactobacillus bulgaricus*

Dinding sel bakteri *Lactobacillus* mengandung peptidoglikan dan juga polisakarida yang melekat pada peptidoglikan dengan ikatan fosfodiester. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain pembentuk lendir (slime) umumnya ditemukan pada susu asam. Komposisi asam amino bakteri dari genus *Lactobacillus* terdiri dari lisin, aspartat, glutamat dan alanin, kecuali pada *L. plantarum* tidak mengandung aspartat dan lisin tetapi digantikan oleh asam diaminopimelat (Williams, 1982). Nutrisi yang dibutuhkan oleh *Lactobacillus* adalah asam amino, peptida, derivat asam nukleat, vitamin, garam, asam lemak atau ester asam lemak dan karbohidrat yang terfermentasi (Sneath *et al*, 1986).

Ngatirah (2000) mengatakan bahwa beberapa strain BAL berpotensi sebagai probiotik karena kemampuannya untuk menghambat bakteri patogen. Rustan (2013) juga mengatakan bahwa sebagian bakteri asam laktat berpotensi memberikan dampak positif bagi kesehatan dan nutrisi manusia, diantaranya adalah meningkatkan nilai nutrisi makanan, mengontrol infeksi pada usus, meningkatkan digesti laktosa, mengendalikan beberapa tipe kanker dan mengendalikan tingkat serum kolesterol dalam darah. Probiotik umumnya terdiri dari satu atau beberapa BAL, misalnya *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Keduanya seringkali digunakan sebagai probiotik karena merupakan mikroorganisme asli dalam ekosistem saluran pencernaan dan telah banyak dilaporkan memiliki sifat antagonis terhadap bakteri-bakteri patogen di dalam usus.

4.6 Pengujian Eksopolisakarida Kasar yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri Asam Laktat

Produksi EPS dari kultur mikroba tergantung pada sejumlah parameter yang berbeda pada tiap spesies dan strain bakteri yang digunakan (Mozzi, 1995). Produksi EPS oleh sejumlah bakteri juga bergantung pada nutrisi medium terutama sumber karbon dan nitrogen, dan fase pertumbuhan (Petry *et al.*, 2000; Emtiazi *et al.*, 2004) serta suhu, pH, konsentrasi oksigen, sistem fisiologi bakteri (aerobik atau anaerobik) dan kondisi fermentasi (Pham *et al.*, 2000). Karena menurut Mozzi (1995) pembentukan polisakarida sering dihubungkan dengan sumber karbon berupa karbohidrat dan temperatur yang lebih rendah atau lebih tinggi dari pertumbuhan optimalnya. Eksopolisakarida dapat diisolasi dan saat ini

telah terbukti dapat dijadikan sebagai imbuhan pangan dan mempunyai aktivitas antitumor.

Pengujian eksopolisakarida kasar bertujuan untuk mengetahui potensi isolat BAL asal markisa ungu untuk menghasilkan eksopolisakarida kasar. Pada pengujian ini, isolat BAL komersial *Lactobacillus casei* digunakan sebagai isolat kontrol. Hasil uji eksopolisakarida kasar ditampilkan dalam tabel 4.4 berikut ini:

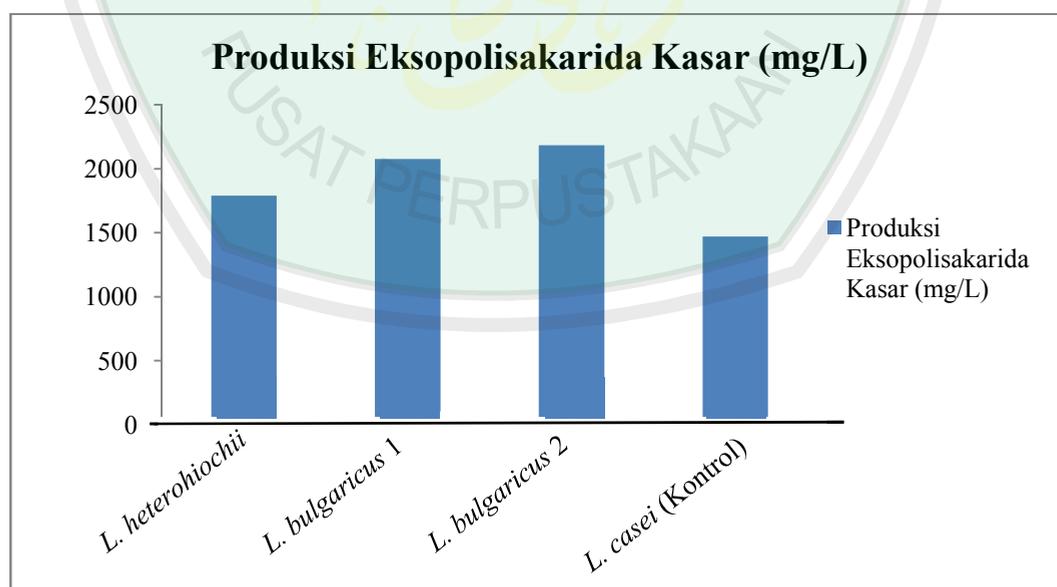
Tabel 4.5 Produksi EPS Kasar dari isolat BAL asal Fermentasi Markisa Ungu

Isolat	EPS Kasar
<i>Lactobacillus heterohiochii</i>	1790 mg/L
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 1	2077 mg/L
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2	2183 mg/L
<i>Lactobacillus casei</i> (Kontrol)	1470 mg/L

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai eksopolisakarida (EPS) yang diperoleh oleh isolat BAL asal fermentasi markisa ungu lebih tinggi daripada isolat BAL komersial, yaitu *Lactobacillus casei*. Nilai EPS yang dihasilkan oleh isolat BAL komersial *L. Casei* pada perlakuan ini adalah 1470 mg/L, pada penelitian Halim (2013) menyebutkan bahwa produksi EPS dari *Lactobacillus casei* adalah 1340 mg/L. Sedangkan isolat T3 yang telah diidentifikasi menggunakan Microbact 12 merupakan *L. bulgaricus* 2 memiliki nilai EPS tertinggi yaitu 2183 mg/L. Isolat T2 yang merupakan *Lactobacillus bulgaricus* 1 memiliki nilai EPS tertinggi kedua, yaitu 2077 mg/L. Isolat T1 yang telah teridentifikasi merupakan *Lactobacillus heterohiochii* memiliki nilai EPS sebesar 1790 mg/L.

Isolat T2 dan T3 teridentifikasi sebagai spesies yang sama yaitu *Lactobacillus bulgaricus*. Namun, hasil eksopolisakarida yang diperoleh oleh

kedua isolat berbeda. Hal ini mungkin dikarenakan berbedanya strain dari kedua isolat ini diakibatkan keragaman genetik yang terjadi di dalam buah markisa ungu terfermentasi yang merupakan tempat diambilnya bakteri-bakteri ini. Berbedanya strain bakteri berarti gen yang dibawa oleh kedua isolat ini juga berbeda, yang mengakibatkan berbedanya proses metabolisme yang dilakukannya sehingga jumlah metabolit yang dihasilkan pun tidak sama. Pham *et al.*, (2000) mengatakan bahwa jumlah EPS yang diproduksi oleh spesies bakteri asam laktat yang berbeda adalah umumnya disebabkan oleh sifat bawaan/ genetik. Suryo (2012) mengatakan bahwa tiap gen mengawasi pembentukan, fungsi dan kemampuan suatu enzim tertentu, sehingga ketika ada gen yang berbeda, yang dalam hal ini dapat merupakan satu spesies namun berbeda strain, dapat mengakibatkan hasil akhir dari suatu proses metabolisme berbeda dengan strain yang lain dalam spesies yang sama.



Gambar 4.5 Grafik Produksi EPS Kasar

Halim (2013) pada penelitiannya menyebutkan bahwa produksi EPS pada 4 isolat BAL asal sawi asin adalah sebesar 1515-1990 mg/L. Nudyanto (2014) juga telah berhasil mengisolasi BAL penghasil EPS dengan kisaran 99-427 mg/L. Pada penelitian lain produksi eksopolisakarida oleh *Lactobacillus casei* yang juga digunakan sebagai isolat kontrol karena merupakan isolat BAL komersial adalah 1340 mg/L (Halim, 2013), dan 106,33 mg/L (Nudyanto, 2014). Produksi EPS dapat meningkat jika nutrisi pada medium pertumbuhannya ditambah, seperti pada penelitian Umam (2007) dan juga Zubaidah (2008).

Kultur yang memproduksi eksopolisakarida (EPS) atau disebut juga kultur ropy telah banyak digunakan sebagai starter susu fermentasi karena meningkatkan kualitas produk yaitu meningkatkan viskositas dan mengurangi sineresis (Teggatz dan Morris, 1990;) dan juga meningkatkan sifat rheologi, tekstur dan cita rasa di lidah (Sikkema dan Oda, 1998; Hess *et al*, 1997; Rawson dan Marshall, 1997); juga telah digunakan untuk meningkatkan sifat fungsional keju Mozzarella dan yoghurt (Hassan *et al.*, 1996; Duboc and Mollet, 2001; Broadbend *et al.*, 2001).

Produksi eksopolisakarida oleh bakteri asam laktat banyak dipanen pada jam ke-24 setelah ditumbuhkan pada 25 mL media cair (Tallon, 2006; Zubaidah, 2008; Suryawira, 2011; Amalia, 2012; Halim, 2013). Sedangkan pada isolat bakteri dari tanaman, produksi eksopolisakarida dipanen pada jam ke-30 setelah ditumbuhkan pada 20 mL media cair (Skerman, 1959; Roberts, 1995; Mukherjee, 2011). Eksopolisakarida diproduksi secara maksimal oleh kultur yogurt yang dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan dari kultur tersebut (Briczinski dan Schieberle, 2009). Sehingga produksi EPS optimum terjadi selama produksi sel

maksimum (Petry *et al.*, 2000), yaitu pada fase stasioner. Pada tahap pertumbuhan selanjutnya terjadi degradasi EPS karena aktivasi enzim EPS merendah dengan berat molekul yang relatif rendah 50,000-10,000 Da (Degeest *et al.*, 2002).

EPS yang didapatkan merupakan eksopolisakarida kasar karena diperoleh berdasarkan perhitungan gravimetri berat eksopolisakarida setelah pengeringan pada suhu 100° C setelah perlakuan hingga didapatkan berat konstan. Eksopolisakarida yang dihasilkan adalah berat EPS bebas sel yang telah dipisahkan dengan proses sentrifugasi 5000 rpm pada suhu 4° C selama 30 menit. Supernatan kemudian ditambahkan dengan aseton teknis yang merupakan pelarut organik dengan laju penguapan yang tinggi. Pengendapan protein dengan pelarut organik seperti aseton akan menghasilkan produk (EPS) dengan aktivitas tinggi. Perlakuan pada produksi EPS ini dilakukan pada suhu rendah (4° C) untuk mencegah denaturasi protein. Endapan yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 10 mL aquades dan asam trikloroasetat 80% untuk mengendapkan protein-protein yang tersisa. Endapan yang dihasilkan tersebut yang kemudian ditimbang sebagai berat kasar EPS.

Mineral dibutuhkan bakteri sebagai akseptor elektron dalam metabolisme glukosa, juga sebagai aktivator enzim, termasuk dalam reaksi polimerisasi eksopolisakarida. Eksopolisakarida adalah polisakarida yang diekresikan oleh mikroba ke luar sel sebagai produk metabolit sekunder saat kondisi lingkungannya tidak menguntungkan, yang saat ini merupakan produk bioaktif. Eksopolisakarida (EPS) dapat diisolasi dan saat ini telah terbukti dapat dijadikan sebagai imbuhan pangan dan mempunyai aktivitas antitumor (Malaka, 2007).

Produksi EPS dari kultur mikroba tergantung pada sejumlah parameter yang berbeda pada tiap spesies dan strain bakteri yang digunakan (Malaka, 2007). Hal ini terbukti pada hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa produksi EPS yang dihasilkan berbeda dari *L. heterohiochi* dan *L. bulgaricus*, juga isolat kontrol *L. casei*. Malaka (2007) menambahkan bahwa pembentukan polisakarida sering dihubungkan dengan sumber karbon berupa karbohidrat dan temperatur yang lebih rendah atau lebih tinggi dari pertumbuhan optimalnya.

Menurut Briczinski dan Schieberle (2009), *Lactobacillus bulgaricus* dapat memproduksi eksopolisakarida, meskipun pada yoghurt produksi eksopolisakarida tertinggi dilakukan oleh *Streptococcus thermophilus*. Sebuah interaksi timbal balik antara dua spesies dari kultur starter yogurt tersebut dapat memproduksi EPS yang lebih tinggi ketika keduanya tumbuh bersama-sama.

Produksi EPS dilakukan pada jam ke-24 yang merupakan fase stasioner atau fase stasioner akhir dari BAL. Hal ini dikarenakan EPS yang diproduksi oleh mikroba pada fase stasioner dapat dimanfaatkan kembali sebagai sumber karbon pada fase menjelang kematian karena adanya enzim yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri yang dapat mendegradasi EPS. Akibatnya perpanjangan waktu inkubasi akan menurunkan produksi EPS. Pham *et al.*, (2000) pada penelitiannya mengatakan bahwa selama fase pertumbuhan eksponensial awal biosintesis EPS tidak terjadi. Produksi terjadi pada fase stasioner menuju kematian. Hindersah (2010) pada penelitiannya menyebutkan bahwa produksi EPS dari *Azetobacter sp.* tinggi pada fase stasioner akhir dan menurun menjelang fase kematian.

Beberapa faktor yang berpengaruh pada produksi EPS adalah suhu dan waktu inkubasi (Cerning, 1990; Malaka, 2004), nilai pH pada medium pertumbuhannya (Mozzi *et al.*, 1996), tipe dari medium pertumbuhannya (Malaka, 2000; Briczinski, 2002), sumber karbon (Mozzi *et al.*, 1996) dan juga sumber mikromineral (Mozzi *et al.*, 1996).

Aplikasi EPS saat ini terbatas pada "ropy" kultur starter susu digunakan untuk memperbaiki tekstur yoghurt dan produk susu fermentasi lainnya. Baik jumlah dan ukuran EPS yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh pilihan yang tepat pada kondisi pertumbuhannya. Konsentrasi polisakarida di laboratorium media dan susu fermentasi biasanya dalam kisaran 50-800 mg/L dan tidak melebihi dari 1,5 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ini efektif untuk memperbaiki tekstur susu fermentasi ketika diproduksi secara *in situ*, tetapi jauh lebih efektif bila ditambahkan secara eksternal sebelum fermentasi oleh strain-starin bakteri penghasil EPS (Tieking, 2005).

Eksopolisakarida berfungsi sebagai "*food stabilizer*" yang mencegah terjadinya sineresis dan pembentukan granula sehingga produk menjadi mengental secara alami (Macura dan Townsley, 1984). Lendir yang secara umum disebut "*exocellular polysaccharides*" ini dihasilkan bakteri asam laktat, yang memperlihatkan tendensi penggunaan strain yang berbeda, media pertumbuhan yang berbeda serta prosedur isolasi dan purifikasi yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda dari satu peneliti dengan peneliti lainnya (Cerning *et al.*, 1990). Hal itu terlihat dari berbedanya hasil EPS yang dihasilkan dari penelitian ini dengan peneliti lain namun tidak berbeda jauh.