

Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Air Cucian Beras Merah dan Uji Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*

Adelya Irawan Manalu^{1*)}, Lukas Pardosi²⁾

^{1,2}Prodi Biologi, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor

*Email (adelyamanalu@unimor.ac.id)

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of microorganisms that produce lactic acid as the main product in the carbohydrate fermentation process. Brown rice washing water is a fairly rich source of carbohydrates, so it has the potential to be an ideal medium for LAB fermentation. This research aims to isolate lactic acid bacteria from fermented brown rice washing water and test its potential as an antibacterial agent against pathogenic bacteria. The methods used were sample preparation, LAB isolation, purification, isolate characterization, and antibacterial testing. Bacterial isolation obtained 2 LAB isolates with different colony characteristics in terms of shape, edges, elevation and color. The isolate is a rod-shaped Gram positive bacterium. The results of the anti-bacterial test against E. coli showed that the diameter of the inhibition zone for the AC1 isolate was 8.62 mm, while for the AC2 isolate it was 6.90 mm.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Fermentation, Red Rice Washing Water, Antibacterial

Abstrak

Bakteri asam laktat (BAL) adalah sekelompok mikroorganisme yang memproduksi asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi karbohidrat. Air bekas pencucian beras merah mengandung karbohidrat yang cukup tinggi, sehingga berpotensi menjadi media yang cocok untuk fermentasi BAL. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi BAL dari fermentasi air cucian beras merah dan menguji kemampuannya sebagai agen antibakteri terhadap bakteri patogen. Metode yang digunakan meliputi persiapan sampel, isolasi BAL, pemurnian, karakterisasi isolat, dan uji antibakteri. Isolasi bakteri menghasilkan dua isolat BAL yang menunjukkan karakteristik koloni berbeda dalam bentuk, tepi, elevasi, dan warna. Isolat tersebut adalah bakteri gram positif berbentuk batang dari genus *Lactobacillus*. Uji antibakteri terhadap *E. coli*, isolat AC1 menghasilkan zona hambat dengan diameter 8,62 mm, sedangkan isolat AC2 menghasilkan zona hambat sebesar 6,90 mm, bakteri tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri.

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat, Fermentasi, Air Cucian Beras Merah, Antibakteri

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok mikroorganisme yang memproduksi asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi karbohidrat. BAL telah banyak digunakan dalam industri pangan dan kesehatan karena memiliki kemampuan probiotik serta sifat antimikroba yang berguna dalam menghambat pertumbuhan patogen (Dalia & Thakur, 2020). Salah satu potensi BAL yang saat ini sedang menjadi fokus penelitian adalah perannya sebagai agen antibakteri alami, yang memiliki kemampuan menghambat mikroba patogen melalui produksi senyawa seperti asam organik, bakteriosin, dan hidrogen peroksida (Omar *et al.*, 2021).

Fermentasi merupakan salah satu metode tradisional yang terbukti efektif untuk meningkatkan jumlah dan aktivitas BAL. Air cucian beras merah adalah sumber karbohidrat yang

cukup kaya, sehingga berpotensi menjadi media yang ideal bagi fermentasi BAL. Beras merah diketahui mengandung banyak nutrisi, termasuk serat, vitamin B, dan mineral, yang mendukung pertumbuhan berbagai mikroorganisme, terutama BAL (Gupta & Sharma, 2021). Selain itu, air cucian beras merah sering kali dibuang, padahal bisa dimanfaatkan sebagai media fermentasi untuk menghasilkan bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan manusia.

BAL hasil fermentasi air cucian beras merah diduga memiliki kemampuan antibakteri yang dapat diaplikasikan sebagai agen penghambat bakteri patogen seperti *Escherichia coli*. Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan isolat BAL dari sumber alami mampu menghasilkan senyawa antibakteri yang efektif, sehingga berpotensi menjadi alternatif bagi antibiotik sintetis (Kumar *et al.*, 2022). Bakteri asam laktat merupakan probiotik yang memiliki manfaat untuk kesehatan saluran pencernaan dan mencegah infeksi akibat mikroba patogen (Desalegn *et al.*, 2020). Tujuan penelitian yaitu untuk mengisolasi BAL dari fermentasi air cucian beras merah lalu menguji potensinya sebagai agen antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi informasi awal penemuan isolat berpotensi sebagai antibakteri yang dapat dimanfaatkan dalam pembuatan antibiotik.

METODE

Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilakukan selama bulan September-November 2024 di Laboratorium Biologi, Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor.

Preparasi Sampel

Beras merah lokal dari NTT sebanyak 150 gram dicuci menggunakan air bersih 200 mL, lalu air bilasan pertama dimasukkan ke dalam botol kaca steril. Mulut botol ditutup dengan kain kasa dan diikat menggunakan karet gelang. Air cucian beras difermentasi selama tiga hari pada suhu ruangan, dan dijauh dari sinar matahari langsung. Cairan keruh pada lapisan tengah hasil fermentasi yang akan digunakan untuk isolasi BAL.

Isolasi BAL

Sebanyak 1 mL sampel air cucian beras dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pepton 1% dan dihomogenisasi dengan vortex. Suspensi yang dihasilkan lalu diencerkan secara bertahap menggunakan metode pengenceran bertingkat hingga pengenceran 10^{-7} . Dari pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-7} , diambil sebanyak 0,1 mL dan disebar pada cawan petri yang berisi media MRS Agar (de Man Rogosa Sharpe Agar) dengan tambahan CaCO_3 1%, menggunakan metode

sebar. Cawan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2x 24 jam, dan diamati (Suhartatik *et al.*, 2014).

Pemurnian Isolat BAL

Isolat BAL yang telah dimurnikan dipilih berdasarkan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Proses pemurnian dilakukan sebanyak tiga kali hingga isolat benar-benar mencapai kemurnian. Kultur murni disimpan pada media miring MRS Agar.

Karakterisasi Isolat BAL

Karakterisasi BAL dilakukan melalui pengamatan makroskopis mencakup pengamatan morfologi koloni, pengamatan mikroskopis, uji katalase, dan uji fermentasi. Karakterisasi mikroskopis dilakukan melalui pewarnaan gram yang kemudian diamati di bawah mikroskop (Sujaya, 2008).

Uji Antibakteri

Uji antibakteri terhadap isolat *E. coli* dilakukan dengan metode difusi cakram pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kultur *E. coli* yang telah disesuaikan dengan kepadatan standar tertentu (biasanya 0,5 McFarland) diinokulasikan ke media tersebut. Selanjutnya, cakram kertas steril dicelupkan dalam suspensi isolat bakteri asam laktat yang akan diuji, kemudian diletakkan di atas permukaan agar yang telah diinokulasikan *E. coli*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C, dan kemudian dilakukan pengukuran zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Pengukuran dilakukan dengan mengukur tiga sisi zona bening yaitu secara horizontal, vertikal dan miring (Romas, 2015).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakterisasi BAL

Hasil isolasi bakteri pada fermentasi air cucian beras merah ditemukan dua isolat BAL, isolat tersebut membentuk zona bening di sekitar koloni bakteri. Proses fermentasi pada air cucian beras terjadi secara alami dengan tanpa adanya penambahan mikrobial dari luar (kultur stater) untuk proses fermentasinya, fermentasi ini disebut fermentasi spontan (Lee & Rahman, 2013). Isolat BAL yang diperoleh dikarakterisasi secara morfologi dengan hasil pada Tabel 1.

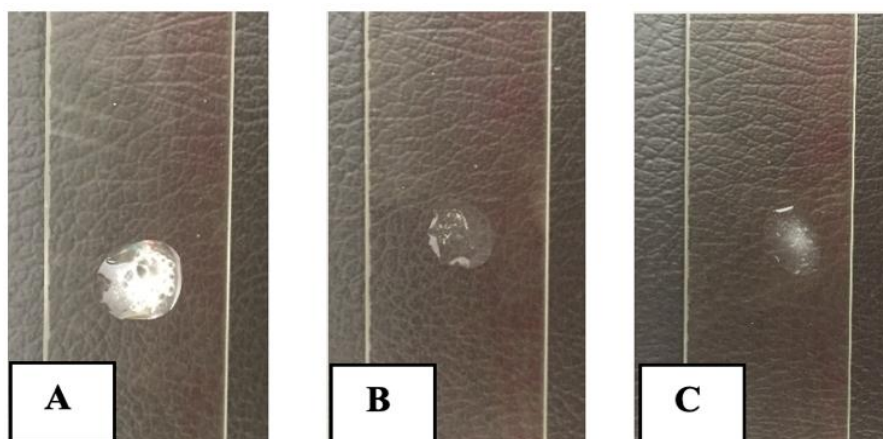
Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat BAL

Kode isolat	Karakteristik Koloni			
	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
AC ₁	Tidak Beraturan	Berombak	Cembung	Putih Susu
AC ₂	Bulat	Licin	Cembung	Putih Susu

Kedua isolat BAL menunjukkan adanya perbedaan secara morfologis seperti pada bentuk dan tepi. Isolat AC₁ memiliki bentuk tak beraturan dan tepi yang berombak sedangkan isolat AC₂ memiliki bentuk bulat dengan tepi licin, sedangkan elevasi kedua isolat tersebut cembung serta warnanya putih susu. Hasil yang serupa juga ditemukan pada Salsabila & Trimulyono (2022) yang memperoleh 5 isolat bakteri asam laktat dari tape pisang kepok dengan ciri bentuk bulat dan lonjong, tepi licin, elevasi ada yang rata dan cembung, serta warna putih kekuningan atau putih susu.

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui produksi enzim *katalase* pada bakteri ini. Enzim *katalase* memiliki fungsi menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen, melindungi bakteri dari efek toksik senyawa tersebut. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk gelembung. Namun, BAL biasanya tidak memiliki enzim *katalase*. Dalam uji ini, H_2O_2 ditambahkan kedalam kedua isolat BAL (AC₁ dan AC₂) menunjukkan hasil negatif atau tidak ada gelembung (Gambar 1), hal ini umum dijumpai pada bakteri asam laktat, karena BAL biasanya hidup di lingkungan anaerobik atau rendah oksigen sehingga tidak membutuhkan enzim *katalase*. Hasil serupa juga didapatkan oleh Suhaeni & Syakur (2016) yang menyatakan isolat yang diperoleh dari dangke menunjukkan hasil uji katalase yang negatif (tidak ada gelembung).

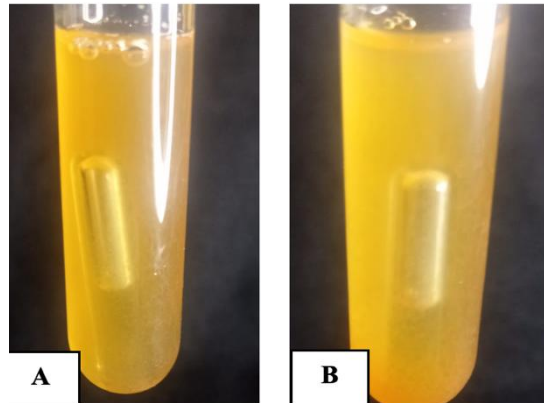


Gambar 1. Uji Katalase. (A) Kontrol Positif: Katalase Positif; (B) Katalase Negatif isolat AC₁; (C) Katalase Negatif isolat AC₂

Uji Fermentasi

BAL dibedakan menjadi kelompok homofermentasi dan heterofermentasi. Pengamatan uji fermentasi dilihat dari gelembung gas yang terbentuk pada tabung durham (Gambar 2). Berdasarkan hasil uji fermentasi kedua isolat (AC₁ dan AC₂) menunjukkan adanya gelembung gas, hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat merupakan tipe heterofermentatif dimana hasil

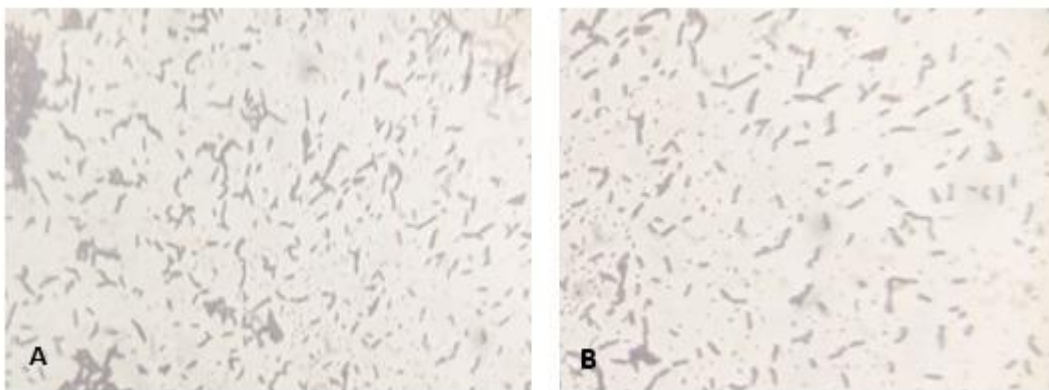
fermentasinya menghasilkan asam laktat, karbondioksida (CO_2) dan etanol. Fermentasi heterofermentatif mengubah sekitar setengah dari total gula menjadi asam laktat, sedangkan sisanya diubah menjadi gas atau alkohol (Yanti & Dali, 2013).



Gambar 2. Uji Fermentasi (A) Isolat AC₁ ; (B) isolat AC₂

Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram adalah metode untuk mengidentifikasi tipe dinding sel bakteri, termasuk bakteri asam laktat. Pada pewarnaan ini, bakteri diberi perlakuan dengan kristal violet sebagai pewarna utama, diikuti dengan larutan iodin, pencucian dengan alkohol atau aseton, dan pewarna tandingan (safranin). Saat dibilas dengan alkohol, terjadi dekolorisasi sehingga dinding sel akan berwarna ungu karena menahan pewarna utama. Sedangkan bakteri gram negatif lapisan dinding sel ada tiga, sehingga ketika dibilas dengan alkohol maka pewarna pertama akan ikut tercuci. Hasil pewarnaan gram pada penelitian ini dapat dilihat bahwa kedua isolat adalah golongan gram-positif (Gambar 3).



Gambar 3. Pengamatan Mikroskopis BAL. (A) Isolat AC₁; (B) Isolat AC₂ pada Perbesaran 10 x 10

Bakteri asam laktat gram-positif akan mempertahankan warna ungu, dikarenakan bakteri tersebut dinding selnya tebal dan kaya akan peptidoglikan (Mukti, 2019), yang mampu

mempertahankan pewarna ungu secara kuat. Dengan hasil pewarnaan gram positif ini, kedua isolat dapat diidentifikasi sebagai kelompok bakteri dengan dinding sel yang kuat, yang membantu bertahan dalam kondisi lingkungan tertentu. Bentuk sel dari bakteri ini yaitu berbentuk basil.

Berdasarkan ciri-ciri makroskopik dan mikroskopik, serta uji katalase dan uji fermentasi, isolat yang diperoleh pada penelitian ini memiliki ciri-ciri serupa dengan bakteri asam laktat golongan *Lactobacillus*. Penelitian Cahyani *et al.* (2020), melakukan isolasi bakteri dari produk fermentasi tempe untuk dikembangkan sebagai bakteri probiotik, pada penelitian tersebut menemukan bahwa bakteri *Lactobacillus plantarum* yang memiliki dengan ciri-ciri koloni yang transparan, kecil, dan berbentuk basil, serta mampu menghasilkan asam laktat.

Uji Antibakteri

Kemampuan isolat BAL dalam menghambat bakteri patogen ditandai dengan terbentuknya zona bening pada area disekitar kertas cakram. Semakin besar zona bening yang terbentuk, maka semakin besar aktivitas penghambatan isolat BAL terhadap bakteri patogen. Hasil uji antibakteri BAL terhadap *E. coli* ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengukuran Zona Bening pada Uji Antibakteri

Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)
AC ₁ (<i>Lactobacillus</i> sp.)	8,62 ± 0,17
AC ₂ (<i>Lactobacillus</i> sp.)	6,90 ± 0,10

Hasil pengukuran zona bening adalah isolat AC₁ memiliki zona hambat lebih besar yaitu 8,62. Penelitian ini menunjukkan zona yang lebih besar dari hasil penelitian Salsabila & Trimulyono (2022) yang menunjukkan bahwa zona hambat isolat BAL yang diisolasi dari tape pisang kepok memiliki rata-rata zona hambat berkisar antara 4,33- 6,00 mm. Pada penelitian ini terdapat perbedaan ukuran diameter zona bening yang dihasilkan isolat AC₁ dengan isolat AC₂, hal tersebut kemungkinan terjadi akibat adanya perbedaan metabolit yang dihasilkan. Besar kecilnya daya hambat yang dihasilkan disebabkan oleh perbedaan senyawa bioaktif yang diproduksi yang berperan dalam mekanisme kerja senyawa antibakteri.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok mikroorganisme gram-positif yang mampu memproduksi asam laktat sebagai produk utama dalam fermentasi karbohidrat. BAL banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, seperti dalam pembuatan yogurt, keju, dan produk fermentasi lainnya. Selain perannya dalam industri makanan, BAL juga dikenal memiliki potensi sebagai agen antibakteri yang dapat melawan bakteri patogen (Khalid, 2011; Hawaz, 2014). BAL dapat menghasilkan berbagai senyawa antimikroba yang efektif dalam melawan patogen bakteri.

BAL memproduksi asam laktat yang mampu menurunkan pH lingkungan, menciptakan kondisi yang kurang mendukung bagi pertumbuhan bakteri patogen. Banyak patogen, seperti *Salmonella*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*, mengalami penghambatan atau kematian pada pH rendah. Penelitian Stark *et al.* (2020) menunjukkan bahwa probiotik BAL, seperti *Lactobacillus rhamnosus* GG, efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen di saluran pencernaan dan membantu memulihkan keseimbangan mikrobiota setelah penggunaan antibiotik.

BAL memfermentasi karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat sebagai produk utama, yang membuat lingkungan sekitar menjadi asam. Asam laktat ini, selain berguna untuk proses pengawetan makanan, juga dapat berperan sebagai antibakteri alami. Penelitian oleh Taheri *et al.* (2015) mengungkapkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap beberapa patogen seperti *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*, melalui produksi asam laktat dan hidrogen peroksida. Bakteri asam laktat menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan beberapa mekanisme seperti memproduksi asam laktat, memproduksi hidrogen peroksida yang dapat merusak membran sel, memproduksi bakteriosin yang dapat menekan pertumbuhan patogen (Cahyani, 2020; Kumar, 2022).

KESIMPULAN

Penelitian memperoleh 2 (dua) isolat yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dengan ciri-ciri koloni bentuk tak beraturan, tepi berombak, elevasi cembung serta warnanya putih. Hasil negatif pada uji katalase, dan hasil uji fermentasi menunjukkan tipe heterofermentatif yaitu fermentasinya menghasilkan asam laktat, karbondioksida (CO₂) dan etanol. Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis, mikroskopis, uji katalase dan uji fermentasi menunjukkan kedua isolat (AC₁ dan AC₂) memiliki ciri-ciri yang seupa dengan genus *Lactobacillus*. Kedua isolat memiliki potensi anti bakteri yang dapat dilihat dari terbentuknya zona bening sebesar 8,62 dan 6,90 mm.

REFERENSI

- Cahyani, F. (2020). Isolation and Characterization of *Lactobacillus plantarum* from Fermented Tempe and Its Probiotic Potential. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 24(2), 79–86.
- Dalia, P., & Thakur, N. (2020). Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria: Mechanisms and Applications in Food Industry. *Journal of Food Microbiology*, 8(2), 112–122.
- Desalegn, B., Lemma, T., & Kebede, B. (2020). Lactic Acid Bacteria and Their Role in Food Preservation and Human Health. *Microbial Biotechnology Journal*, 3(4), 125–134.

- Gänzle, M. G., & von Neubeck, M. (2017). Lactic Acid Bacteria in Food Fermentation. Springer.
- Gupta, R., & Sharma, S. (2021). Utilization of Rice Bran and By-products in Functional Food Development. *Food Research International*, 139, 110030.
- Hawaz, Estifanos. (2014). Isolation and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria Curd and In Vitro Evaluation of Its Growth Inhibition Activities Againsts Pathogenic Bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 8(13): 1419-1425.
- Ibrahim, Arsyik. (2015). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1(2): 159-163.
- Khalid, K. (2011). Antimicrobial Interaction of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* Against Some Pathogenic Bacteria. *International Journal of Bioscience*, 1(3): 39-44.
- Kumar, P., Verma, R., & Singh, S. (2022). Isolation of Antimicrobial Lactic Acid Bacteria from Natural Sources: Characterization and Potential Application. *International Journal of Microbiology*, 11(1), 45–58.
- Lee, Y. T., Mohamed, A. R., & Rahman, K. A. (2013). Survival and Activity of Lactic Acid Bacteria in Spontaneous Fermentation of Rice Wash Water. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 692-696.
- Mukti, N.H., Laras,R., Romadhon. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E.coli* dan *S.aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 12-21.
- Suhartatik, N., Cahyanto, M. N., Rahardjo, S., Miyashita, M. and Rahayu, E. S. (2014) Isolation and identification of lactic acid bacteria producing [Beta] glucosidase from Indonesian fermented foods. *International Food Research Journal*, 21(3): 937-942.
- Omar, M., Salim, S., & Yasir, N. (2021). Probiotic Potential and Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria: An Overview. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 275–289.
- Qonita, S.B.,Johan, V.S., & Rahmayuni. (2018). Identifikasi Genus Bakteri Asam Laktat Dari Nira Aren Terfermentasi Spontan. *Jurnal Jom Faperta*, 5(1) 1-12.
- Taheri, R., Ghoreishi, S. M., & Motamedifar, M. (2015). Antibacterial Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(3), 254-263.
- Salsabila, K.N., & Trimulyono, G. (2022). Isolasi dan Uji Antagonis Bakteri Asam Laktat dari Tape Pisang Kepok Terhadap *Eschericia coli*. *Lentera Bio*, 11(3), 430-440.
- Stark, K., Schöni, S., & Langer, T. (2020). Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Antimicrobial Effects on Gut Pathogens. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1000-1012.
- Sujaya, Nengah (2008). Isolasi dan karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner*, 9(2): 52-59.
- Yanti, Dwi Indah Widya dan Dali, F. A. 2013. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Selama Fermentasi Bakasang. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 16(2).