

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI
LIMBAH CAIR TAHU DI PABRIK TAHU BINTANG OESAPA
KECAMATAN KELAPA LIMA KOTA KUPANG**

**Amor T. Karyawati, Rony S. Mauboy, Maria T.L. Ruma
Joice J. Bana, Djeffry Amalo, Evodius Suhardi**

Program Studi Biologi FST Undana

ABSTRAK

Limbah tahu merupakan sisa hasil produksi tahu yang dapat digunakan sebagai sumber dari bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat termasuk golongan mikroorganisme yang aman ditambahkan pada makanan karena tidak menghasilkan toksin dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asam laktat pada limbah tahu di pabrik tahu Bintang Oesapa Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang. Tahapan penelitian ini meliputi pengambilan sampel limbah cair tahu, sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media, isolasi BAL, karakterisasi BAL secara makroskopik dan mikroskopik, uji katalase dan uji fermentasi glukosa. Hasil penelitian menunjukkan 14 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tahu, yang diambil dari Pabrik tahu Bintang Oesapa Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang. Karakteristik isolat BAL yaitu tumbuh pada media selektif MRS agar dengan pengamatan makroskopis menunjukkan karakteristik yang bervariasi baik dari bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan warna koloni. Bentuk koloni bulat, tepi koloni tepi rata (*entrie*), elevasi koloni cembung dan datar, elevasi koloni cembung dan datar, warna koloni putih susu dan putih pucat, merupakan Gram positif, berbentuk *basil* katalase negatif, terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning pada uji glukosa, dan memiliki tipe fermentasi *homofermentatif*.

Kata Kunci : *Bakteri asam laktat, limbah tahu, isolasi karakterisasi*

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang terdapat pada bahan seperti susu, daging atau bahan lain yang mudah rusak dan digunakan untuk memproduksi bahan pangan olahan. Bakteri asam laktat (BAL) ini mempunyai banyak keunggulan diantaranya adalah menghasilkan senyawa antibakteri, memiliki resistensi terhadap kondisi intestinum (lambung dan usus), mampu hidup pada mucus intestinal dan melekat pada sel epitelium intestinal, banyak digunakan sebagai starter produk bahan makanan olahan fermentatif, mampu menghasilkan enzim pencernaan ekstraseluler, dan mampu menstimulasi 2 sistem immunitas intestinal (Subagiyo *dkk.*, 2017).

Bakteri asam laktat (BAL) ini mempunyai banyak keunggulan diantaranya adalah menghasilkan senyawa antibakteri, memiliki resistensi terhadap kondisi intestinum (lambung dan usus), mampu hidup pada mucus intestinal dan melekat pada sel epitelium intestinal, banyak digunakan sebagai starter produk bahan makanan olahan fermentatif, mampu menghasilkan enzim pencernaan ekstraseluler, dan mampu menstimulasi 2 sistem immunitas intestinal (Subagiyo *dkk.*, 2017).

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk golongan mikroorganisme yang aman ditambahkan pada makanan karena tidak menghasilkan toksin dan dikenal dengan sebutan *food grade* microorganism yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan (Afriani, 2017). Sebagian BAL berpotensi memberikan dampak positif bagi kesehatan dan nutrisi manusia. Yogurt merupakan salah satu makanan dengan penambahan BAL.

Tahu merupakan makanan tradisional sebagian besar masyarakat di Indonesia, yang digemari hampir seluruh lapisan masyarakat. Selain mengandung gizi yang baik, pembuatan tahu juga relatif murah dan sederhana. Hal tersebut akan mengakibatkan kadar oksigen dalam air menurun tajam. Limbah industri cair tahu mengandung zat tersuspensi, sehingga mengakibatkan air menjadi kotor atau keruh (Subekti, 2011).

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel

Limbah cair tahu diambil dari pabrik tahu Bintang Oesapa. Sampel diambil dari pembuangan limbah menggunakan wadah kemudian dituangkan ke dalam botol sampel steril, dipastikan wadah sampel tertutup erat dan dimasukkan ke dalam cool box. Sampel dapat dibawa ke laboratorium untuk diperiksa lebih lanjut

Pembuatan Media

Pembuatan NaCl 0,9% steril. Disiapkan alat dan bahan, NaCl, akuades, kapas, aluminium foil, dan kertas buram yang digunakan. Lalu timbang NaCl 0,9 gram dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL, kemudian dihomogenkan dan ditutup dengan kapas, aluminium foil dan kertas buram, dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan MRS agar. Disiapkan alat autoklaf, *hotplate*, petridish, oven, lemari pendingin dan bahan MRS agar, akuades 200 mL, kapas, aluminium foil, dan kertas buram, kemudian ditimbang media MRS Agar 12,4 gram dilarutkan dalam 200 mL akuades dan dihomogenkan dengan *hotplate stirrer* lalu ditutup dengan kapas, aluminium foil dan kertas buram dan

disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituang 15 mL pada petridish yang telah disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, ditunggu sampai memadat, dibungkus dengan kertas buram dan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C.

Pembuatan media glukosa untuk media pertumbuhan bakteri. Disiapkan alat erlenmeyer, timbangan, *hotplate stirrer*, tabung dan pipet, autoklaf dan bahan APW, yang digunakan kemudian diberi tanda pada Erlenmeyer dengan menambahkan pelarut alkaline pepton water (APW) dari gelas ukur. Ditimbang media glukosa setelah itu dimasukkan media yang telah ditimbang pada Erlenmeyer dan ditambahkan APW sesuai tanda batas lalu dihomogenkan dengan *hotplate stirrer* hingga larut setelah itu ambil 5 ml dan dimasukkan kedalam tabung steril kemudian disteril dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan mengambil 1 mL sampel limbah tahu lalu dencerkan (10^{-1} - 10^{-4}) dan dihomogenkan dengan menambahkan 9 mL garam fisiologis (NaCl 0,9 % steril) Hasil pengenceran kemudian diinokulasi di MRS agar yang sudah ditambah 1 % CaCO_3 , dengan menggunakan metode streak plate yang kemudian diinkubasi 37°C selama 48 jam, koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya dikarakterisasi.

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Pewarnaan Gram. Kaca objek dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% dan dilewatkan beberapa kali di atas api bunsen, kaca objek kemudian di tetes

NaCl 0,85% secukupnya, isolat bakteri diambil dengan ose secara aseptik dan dibuat apusan dengan cara dioleskan pada kaca objek yang telah berisi NaCl 0,9% kemudian Kaca objek yang telah dibuat apusan difiksasi kembali pada api bunsen dan di diletakkan pada rak pengecatan dengan bagian hapusan menghadap ke atas, lalu ditetaskan kristal violet pada apusan sampai seluruh bagian apusan tergenang, dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir, ditetaskan dengan larutan iodin sampai seluruh bagian hapusan tergenang dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir, Selanjutnya isolat bakteri ditetesi alkohol 96% selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir, ditetaskan safranin selama 45 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian Preparat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian preparat diamati di bawah mikroskop Sel bakteri yang berwarna ungu, memperlihatkan bahwa bakteri termasuk kelompok Gram +

Uji katalase. Kaca objek dibersihkan menggunakan alkohol 70% lalu ditetaskan larutan hidrogen peroksida pada kaca objek kemudian ambil koloni tunggal menggunakan ose secara aseptis dan dicampurkan koloni dengan hidrogen peroksida pada kaca objek, amati terbentuknya gelembung gas pada preparat, jika terbentuknya gelembung gas menunjukkan reaksi positif terhadap uji katalase.

Uji fermentasi glukosa. Diambil koloni tunggal pada agar dengan menggunakan ose secara aseptik dan dimasukkan ke dalam media glukosa yang telah berisi tabung durham terbalik kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam

lalu diamati terbentuknya gas pada tabung Durham, jika Adanya perubahan warna merupakan ciri adanya bakteri asam laktat menggunakan dan diperhatikan ada atau tidaknya gelembung gas untuk mengetahui jenis bakteri termasuk *heterofermentatif* atau *homofermentatif*.

Analisis Data

Data dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif kualitatif, dimana datanya disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri asam laktat dari limbah tahu

Sebelum memasuki tahap isolasi, sampel terlebih dahulu dilakukan pengenceran bertingkat yang bertujuan untuk memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan serta mendapatkan koloni bakteri yang terpisah ketika ditumbuhkan pada medium. Hasil pengenceran kemudian ditanam menggunakan teknik *spread plate* (cawan sebar) pada media selektif MRSA yang disuplementasi dengan CaCO₃ 1 % dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Berdasarkan hasil penelitian, setelah dilakukan proses penumbuhan bakteri dan proses isolasi di peroleh 18 isolat, yang dimana 14 diantaranya bakteri asam laktat dan 4 lainnya terkontaminasi. Ke-14 bakteri asam laktat memiliki karakteristik yang sama secara makroskopis, mikroskopis, uji katalase dan juga uji fermentasi glukosa. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan karakteristik yang bervariasi baik dari bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan warna. Bentuk koloni bulat, tepi koloni tepi rata (*entrie*), elevasi koloni cembung dan datar, elevasi koloni cembung dan datar, warna koloni putih susu dan putih pucat.

Karakterisasi Makroskopis

Pengamatan karakteristik secara makroskopik adalah proses pengamatan yang dilakukan dengan melihat langsung morfologi luar koloni bakteri yang tumbuh pada media agar yang meliputi bentuk, tepi, elevasi dan warna (Ibrahim *dkk.*, 2017). Pada penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil yaitu isolat bakteri yang telah diamati pada sampel ini memiliki ciri-ciri yang hampir sama, yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat dari limbah tahu

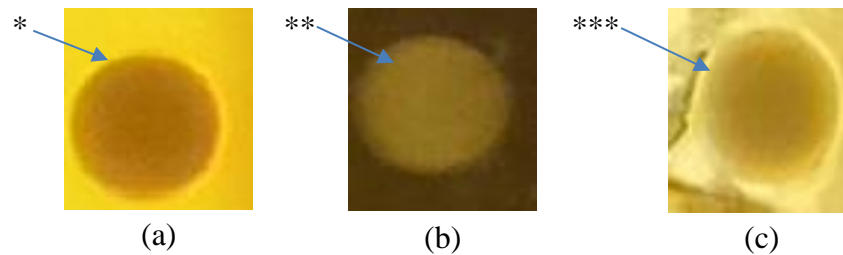
Kode isolat	Morfologi koloni			
	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna
Blt 1	Bulat	<i>Serrate</i>	Datar	Putih Pucat
Blt 2	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 3	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 4	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 5	Bulat	<i>Serrate</i>	Datar	Putih Pucat
Blt 6	Bulat	<i>Serrate</i>	Datar	Putih Pucat
Blt 7	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 8	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 9	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 10	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 11	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 12	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 13	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 14	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 15	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 16	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu
Blt 17	Bulat	<i>Serrate</i>	Datar	Putih Pucat
Blt 18	Bulat	<i>Entire</i>	Cembung	Putih susu

Ket : Blt (Bakteri Asam Laktat Limbah Tahu)

Berdasarkan data pada tabel 1 , dapat diketahui bahwa isolat dengan kode BLT 2, BLT 3, BLT 4, BLT 7, BLT 8, BLT 9, BLT 10, BLT 11, BLT 12, BLT 13, BLT 14, BLT 15, BLT 16, BLT 18, memiliki persamaan baik dari bentuknya yang bulat namun berbeda ukuran, elevasi yang cembung, tepi rata (*Entire*) dan warna putih susu. Sedangkan untuk 4 isolat lainnya, yaitu isolat dengan kode BLT 1, BLT 5, BLT 6, dan BLT 17 memiliki ciri bentuk bulat, tepi tidak beraturan, elevasi datar, warna putih pucat dan tidak memiliki zona jernih di sekitar koloni.

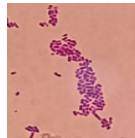
Hal ini terjadi karena ke-4 isolat tersebut telah terkontaminasi, bakteri yang terkontaminasi ini terjadi karena kurangnya disiplin dalam melakukan isolasi bakteri.

Menurut hasil penelitian (Suciati *dkk.* 2016), koloni yang diduga sebagai koloni bakteri asam laktat memiliki ciri berwarna putih susu hingga putih kekuningan, berbentuk bulat, elevasi cembung, dan memiliki tepian berwarna bening atau zona/daerah yang jernih di sekitar koloni. Zona/daerah jernih yang muncul di sekitar koloni bakteri diakibatkan oleh kandungan asam pada BAL yang tumbuh sehingga mampu menetralkan sifat basa dari CaCO_3 .



Gambar 1. Koloni BAL. (a) Koloni BAL dengan zona jernih di sekitarnya dan diduga sebagai bakteri asam laktat (berwarna putih) (*), (b) Koloni BAL dengan warna putih susu(**), (c) Bukan Bakteri Asam Laktat (Kontaminan)(***)

Karakterisasi Mikroskopik

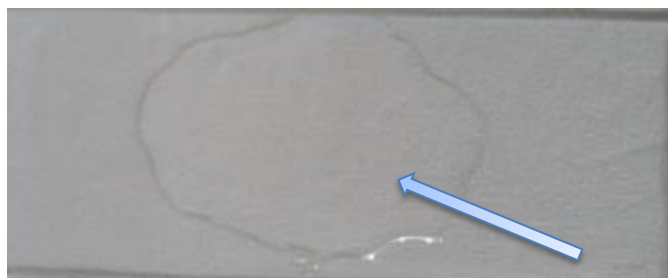


Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram, yaitu Gram positif

Berdasarkan proses pewarnaan Gram yang telah dilakukan, dinding sel bakteri yang memiliki Gram positif akan berwarna ungu sedangkan bakteri dengan Gram negatif akan berwarna merah. Hal ini dapat terjadi karena bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif mempunyai perbedaan struktur dinding sel bakteri yang menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan larutan pemucat. Dinding sel pada bakteri Gram positif sebagian besar terdiri dari peptidoglikan, dimana akan terbentuk persenyawaan kompleks kristal violet yodium ribonukleat yang tidak larut dalam larutan pemucat, sedangkan pada bakteri Gram negatif dinding selnya memiliki kandungan lipida yang tinggi, dimana lipida ini akan larut dalam alkohol dan aseton yang digunakan sebagai larutan pemucat (Hidayat & Alhadi, 2012).

Uji Katallase

Uji katalase dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan enzim katalase dengan menggunakan reagen H₂O₂ 3% yang ditetesi pada isolat dan dikatakan positif apabila pada isolat timbul gelembung udara yang menandakan terbentuknya gas CO₂ (Utama et al., 2018). Hasil uji katalase bahwa ke-14 isolat memberikan reaksi negatif terhadap uji katalase, dimana tidak timbulnya gelembung udara, setelah dilakukan pengujian yaitu uji katalase dengan menggunakan hidrogen peroksida, dengan diamati terbentuknya gelembung. Bakteri asam laktat tidak memproduksi enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dan berkaitan dengan kemampuan bakteri asam laktat yang hanya membutuhkan sedikit oksigen untuk dapat hidup.



Gambar 3. Hasil Uji Katalase

Uji fermentasi dari glukosa

Pada uji aktivitas isolat BAL dalam fermentasi glukosa ini diawali dengan fermentasi isolat bakteri asam laktat, dimana 1 ose bakteri asam laktat diinokulasi ke dalam media MRSB dan diinkubasi pada suhu 37°C. Fermentasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan suspensi MRSB yang mengandung asam laktat (Kurnia et al., 2020). Fermentasi asam laktat ini dapat terjadi karena adanya aktivitas bakteri asam laktat.

Gambar 4 merupakan gambar media MRSB yang telah diinokulasi dengan bakteri asam laktat dan siap untuk diinkubasi. Setelah diinkubasi selama 24 jam, selanjutnya dilakukan fermentasi glukosa dengan mengambil 1 ml hasil inkulasi dari MRSB yang telah divortex terlebih dahulu dan dimasukkan kedalam media glukosa yang telah disiapkan.

Bakteri asam laktat yang diperoleh digolongkan menjadi dua kelompok yaitu homofermentatif dan kelompok *heterofermentatif*. Pengamatan dilihat dengan terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Proses fermentasi *homofermentatif* menghasilkan satu jenis komponen saja, yaitu asam laktat, sedangkan fermentasi *heterofermentatif* menghasilkan berbagai senyawa atau komponen lainnya, misalnya etanol, asetat, asam laktat dan karbondioksida.

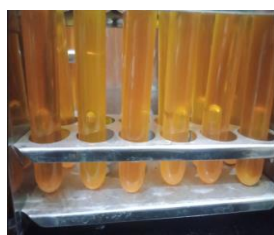
Berdasarkan uji fermentasi glukosa dari ke-14 isolat yang diuji didapatkan bahwa semuanya mampu memfermentasi glukosa dengan sempurna, yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang mulanya warna merah berubah menjadi warna kekuningan, dan adanya gelembung gas dan hanya mampu memproduksi asam laktat, etanol, asam asetat dan CO₂ yang menandakan jenis bakteri *heterofermentatif*.



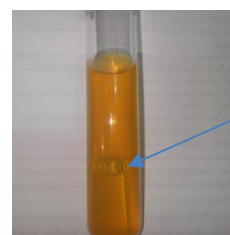
Gambar 4. Media MRSB yang sudah diinokulasi BAL



Gambar 5. Media glukosa sebelum difermentasi



Gambar 6. Media glukosa setelah fermentasi



Gambar 7. Hasil uji fermentasi glukosa

PENUTUP

Simpulan

1. Diperoleh 14 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair tahu, yang diambil dari Pabrik tahu Bintang OesapaKecamatan Kelapa Lima Kota Kupang
2. Karakteristik isolat BAL yaitu tumbuh pada media selektif MRS agar dengan pengamatan makroskopis menunjukkan karakteristik yang bervariasi baik dari bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, dan warna koloni. Bentuk koloni bulat, tepi koloni tepi rata (*entrie*), elevasi koloni cembung dan

datar, elevasi koloni cembung dan datar, warna koloni putih susu dan putih pucat, merupakan Gram positif, berbentuk *basil* katalase negatif, terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning pada uji glukosa, dan memiliki tipe fermentasi *homofermentatif*.

Saran

1. Adanya bakteri asam laktat pada limbah tahu diharapkan dapat dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui manfaat dari bakteri asam laktat yang terdapat pada limbah tahu.
2. Limbah tahu bisa digunakan untuk makanan ternak dan pupuk tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, N., Yusmarini, Y., & Pato, U. (2017). *Aktivitas antimikroba lactobacillus plantarum 1 yang diisolasi dari industri pengolahan pati sagu terhadap bakteri patogen escherichia coli FNCC-19 dan staphylococcus aureus FNCC-15* (Doctoral Universitas Riau).
- Ibrahim, A., Fridayanti, A., & Delvia, F. (2017). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dari buah mangga (*Mangifera indica L.*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1 (2), 159-163
- Kurnia, M., Amir, H., & Handayani, D. (2020). *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Makanan Tradisional Suku Rejang Di Provinsi Bengkulu : "Lemea"*. *Alotrop*, 4 (1), 25-32.
- Putri, Y. W., A. E. Putra, dan B. I. Utama. (2018). Identifikasi Dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Vagina Wanita . *Jurnal Kesehatan Andalas*, 7(3): 20–25
- Subagiyo, S. M., T., W. A. Setyati, F. Sri, R. Pramesti. (2017). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Intestinal Udang Penaeid Tipe Liar Terhadap Bakteri Vibrio. *Jurnal Kelautan Tropis*, 20(1): 7.
- Suciati, P., Tjahjaningsih, W., Masithah, E. D., & Pramono, H. (2016). Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla spp.*) Sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 8 (2) : 94-108.
- Sukma Dewi, N. P. D., Burhannuddin, B., & Ratih Kusuma Ratna, G. A. M. (2020). *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Limbah Tahu di Desa Sampalan Kabupaten Klungkung* (Doctoral dissertation, Politeknik Kesehatan Denpasar).
- Sunaryanto, R. & Bambang Marwoto. (2013). *Isolasi, Identifikasi, Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Dadih Susu Kerbau*. *Sains dan Teknologi Indonesia*, 14 (3) : 228-233.
- Suryani, S., Wignyanto, W., & Sukardi, S. (2020). Pemanfaatan Limbah Cair (Whey) Industri Tahu Menjadi Nata de Soya dan Kecap Berdasarkan Perbandingan Nilai Ekonomi Produksi. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 4(2).
- Utama, C. S., Zuprizal, Hanim, C., & Wihandoyo. (2018). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Selulolitik yang Berasal dari Jus Kubis Terfermentasi. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7 (1) : 1-6.