

## IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT INDIGENOUS DARI BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)

[IDENTIFICATION OF INDIGENOUS LACTIC ACID BACTERIA FROM  
BILIMBING (*AVERRHOA BILIMBI* L.)]

MURNA MUZAIFA\*

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala

### ABSTRACT

The objective of this study was to identify indigenous lactic acid bacteria from bilimbi. Seven isolates were selected from bilimbi. Isolates were identified by morphological and biochemical characteristics and their ability to ferment carbohydrates. Three species of lactic acid bacteria from bilimbi were identified, as *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus plantarum*.

**Key words:** bilimbi, isolate, identification, indigenous, lactic acid bacteria

### PENDAHULUAN

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) atau sering disebut belimbing asam dikenal cukup baik oleh masyarakat Indonesia. Rasa buahnya yang asam dan aroma yang khas membuat belimbing wuluh sering digunakan dalam masakan. Belimbing wuluh termasuk suku atau famili *Oxalidaceae*. Hampir di semua daerah di Indonesia terdapat belimbing wuluh dan setiap daerah mempunyai nama tertentu sehingga di Indonesia belimbing wuluh mempunyai 25 nama lebih antara lain: *limeng* (Aceh); *selemeng* (Gayo); *asom belimbing*, *balimbingan* (Batak); *malimbi* (Nias); *balimbing*, *blimbing*, *blimbing wuluh* (Jawa); *balingbing*, *calingcing*, *calingcing wulet* (Sunda); *bhalingbing bulu* (Madura); *blingbing buloh* (Bali); *calene* (Bugis). Di luar tanaman ini dikenal dengan nama *malibi* (Halmahera); *bilimbi* (Inggris); *cucumber tree* (Inggris); dan *kamias* (Filipina) (Wijayakusuma, 1993; Anonim, 2005).

Berbeda dengan belimbing manis yang umumnya dikonsumsi sebagai buah segar, belimbing wuluh dengan rasanya yang sangat asam lebih sering digunakan dalam bentuk campuran sayur-sayuran. Selain itu belimbing wuluh juga sering digunakan sebagai obat

tradisional untuk berbagai penyakit. Komposisi kimia yang terdapat dalam belimbing wuluh adalah asam oksalat, saponin, tanin, glukosida, kalsium oksalat, sulfur, asam format, peroksida dan kalium sitrat ( Roy dan Joshi, 1995; Manan, 2002).

Khususnya di Aceh, belimbing wuluh sering digunakan dalam bentuk olahan yang dikenal dengan sebutan *asam sunti*. Produk ini sejenis pickel yang difermentasi dengan penggaraman kering, berwarna coklat, berasa asam dan sedikit asin serta mempunyai tekstur lembut agak kenyal. Digunakan sebagai bumbu khususnya pemberi rasa asam dan aroma spesifik Aceh.

Walaupun penggunaan *asam sunti* sebagai bumbu masakan oleh masyarakat Aceh telah ada sejak zaman dulu, pengkajian ilmiah tentang produk ini relatif masih sangat terbatas. Sebagai produk fermentasi, banyak faktor-faktor dalam pengolahan *asam sunti* yang perlu dieksplorasi. Proses fermentasi melibatkan mikroorganisme yang akan merubah karakteristik fisikokimia dan mikrobiologis dari suatu bahan baku, demikian pula pada *asam sunti*. Hasil penelitian pendahuluan oleh Muzaifa (2008) menunjukkan bahwa terjadi kenaikan total asam laktat pada produk *asam sunti*. Diduga

\* Korespondensi penulis: E-mail: murnathp@yahoo.com

bakteri asam laktat terlibat dalam fermentasi *asam sunti*, sebagaimana umumnya terjadi pada produk fermentasi sayur dan buah dengan proses penggaraman (Steinkraus, 1983; Molin, 2003). Peranan bakteri asam laktat tersebut tidak terlepas dari keberadaan bakteri asam laktat alami yang terdapat pada belimbing wuluh sebagai bahan baku *asam sunti*.

Berkaitan dengan peranan bakteri asam laktat yang semakin berkembang, telah banyak dilakukan identifikasi bakteri asam laktat dari berbagai ekologi. Bakteri asam laktat merupakan kekayaan alam yang tersebar di Indonesia, namun koleksi bakteri asam laktat asli Indonesia (indigenus) masih terbatas. Eksplorasi bakteri asam laktat dari lingkungan alam Indonesia dilakukan untuk meningkatkan koleksi bakteri asam laktat asli Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang terdapat pada belimbing wuluh.

## BAHAN DAN METODE

Belimbing wuluh, akuades, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, indikator *phenol red*, safranin, media MRS (agar dan *broth*), media glukosa cair, NaCl, kristal violet, amonium oksalat dan iod. Bahan kimia yang digunakan berlabelkan *pa (pro analysis) Merck*.

Alat yang digunakan adalah peralatan analisis berupa alat-alat gelas, timbangan elektrik AEL-200 Shimadzu, *mixer type 3700 Thermolyne*, *autoclave*, lampu bunsen, inkubator Heraeus D6450, *cooling incubator MG-KT-2 Autonics*, *laminar air flow ESC*, mikroskop Olympus NEA, kit Microbact, aluminium foil, jarum ose, mikropipet, dan *colony counter Galaxy 230*.

## Prosedur Penelitian

### Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sampel berupa belimbing wuluh dipotong-potong, ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan kedalam 90 ml akuades steril. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan divortek selama 10 menit. Suspensi yang diperoleh diencerkan dengan pengenceran berseri hingga 10<sup>-3</sup> kemudian secara aseptik diambil dengan pipet 1 ml *aliquot* dan dimasukkan kedalam cawan

petri yang telah ditandai seri pengencerannya. Selanjutnya dituangi MRS agar yang masih cair, dibiarkan memadat kemudian diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 37°C selama 72 jam. Selanjutnya dipilih koloni tunggal dari setiap cawan, dimurnikan dengan metode *streaking* pada media yang sama dan diinkubasi 37°C selama 72 jam. Selanjutnya kultur murni tersebut ditanam kembali didalam media agar miring hingga siap untuk diidentifikasi (Modifikasi Fardiaz, 1997).

### Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi bakteri asam laktat didasarkan pada sifat morfologi, fisiologi, dan biokimia dari bakteri. Uji sifat morfologi meliputi pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel dengan mikroskop. Uji fisiologi dan biokimia meliputi uji katalase (Koneman, *et al.* 1988), uji kemampuan menghasilkan gas (Cappucino and Sherman, 1987), uji kemampuan tumbuh pada temperatur 10°C dan 45°C (Leveu, *et al.* 1995), uji kemampuan tumbuh pada NaCl 6,5% (Savado, *et al.* 2004) dan uji kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat (*Microbact*, Oxoid).

Hanya isolat yang menunjukkan Gram positif (+) dan katalase negatif (-) yang akan diidentifikasi lebih lanjut karena kedua hasil uji tersebut merupakan sifat umum bakteri asam laktat (Sharpe, 1979). Penentuan genera bakteri asam laktat dilakukan dengan melihat bentuk sel, kemampuan menghasilkan gas, kemampuan untuk tumbuh pada suhu 10°C, 45°C dan garam 6,5% (Rahayu, 2004). Selanjutnya dilakukan uji fermentasi karbohidrat menggunakan *kit* yang mengandung beberapa jenis karbohidrat (*Microbact*, Oxoid), terdiri atas glukosa, manitol, xilosa, inositol, sorbitol, ramnosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol, rafinosa dan salisin.

Seluruh hasil pengujian tersebut dicocokkan dengan *Bergey's manual* dan pustaka pendukung yang memuat karakteristik bakteri asam laktat yang ditemukan (Elliot and Facklam, 1995; Holt, *et al.*, 1994; Lucke and Schillinger, 1987).

**Analisis data**

Penelitian ini bersifat laboratorium eksploratif. Data hasil identifikasi bakteri asam laktat dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Identifikasi Bakteri Asam Laktat**

Batas pengelompokan bakteri asam laktat hingga saat ini masih diperdebatkan. Sebelumnya klasifikasi bakteri asam laktat serta karakterisasinya yang umum digunakan terdapat dalam *Bergey's Manual Systematic Bacteriology* Vol II. Anggotanya terdiri dari dua famili yaitu *Streptococcaceae* dan *Lactobacillaceae*. Famili *Streptococcaceae* terdiri dari bentuk kokus atau bulat telur dari genus *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* sedangkan famili *Lactobacillaceae* merupakan bentuk batang yang anggotanya terdiri dari satu genus yaitu *Lactobacillus* (Wibowo, 1989). Keempat

genera tersebut merupakan dasar klasifikasi dari bakteri asam laktat dan meskipun saat ini masih bertahan namun beberapa genera telah mengalami beberapa perubahan membentuk genera baru.

Terjadinya perubahan-perubahan dalam klasifikasi bakteri asam laktat yang menghasilkan beberapa genera baru disebabkan oleh semakin majunya teknologi di bidang biokimia, fisiologi, sitologi, dan genetika mikroorganisme. Walaupun demikian, kelompok bakteri asam laktat yang paling mendapat perhatian dalam industri pangan terdiri atas 6 genera yaitu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* dan *Pediococcus* (Axelsson, 1998; Moir, *et al.*, 2001).

Dalam penelitian ini diperoleh sebanyak 7 isolat pada tahap isolasi. Isolat tersebut dikelompokkan menjadi 3 grup (A, B dan C) berdasarkan perbedaan hasil karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia bakteri asam laktat yang diisolasi dari belimbing wuluh.

Karakteristik	Grup Bakteri Asam Laktat (n = 7)		
	A n = 3	B n = 2	C n = 2
Bentuk	kokus	kokus	batang
Gram	+	+	+
Katalase	-	-	-
Produksi gas	-	-	-
Glukosa	+	+	+
Manitol	+	+	+
Xilosa	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	+	-	+
Ramnosa	-	-	-
Sukrosa	+	+	+
Laktosa	+	+	+
Arabinosa	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Rafinosa	-	-	+
Salisin	+	-	+
Suhu 10 °C	+	-	+
Suhu 45 °C	+	+	+
NaCl 6,5 %	+	-	td
Bakteri asam laktat yang diduga	<i>E. faecalis</i>	<i>L. Lactis subsp lactis</i>	<i>L. plantarum</i>

<sup>a</sup> Keterangan : n= jumlah isolat , + = reaksi positif, - = reaksi negatif, td= tidak dilakukan

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa seluruh isolat menunjukkan Gram positif dan katalase negatif yang membuktikan bahwa isolat yang diperoleh adalah kelompok bakteri asam laktat. Sharpe (1979) menyebutkan bahwa kedua sifat tersebut merupakan sifat umum bakteri asam laktat.

Grup A terdiri atas 3 isolat, mempunyai bentuk kokus, Gram positif, katalase negatif, tidak menghasilkan gas, mampu memfermentasi glukosa, manitol, sorbitol, sukrosa, laktosa, salisin, mampu tumbuh pada suhu 10°C, 45°C dan NaCl 6,5%. Penentuan genus berdasarkan bentuk sel kokus, tidak menghasilkan gas dari glukosa, mampu tumbuh pada suhu 10°C, 45°C, dan 6,5% NaCl (Rahayu, 2004). Sedangkan kunci determinasi spesiesnya adalah kemampuan menghasilkan asam dari sorbitol dan ketidakmampuan memfermentasi rafinosa (Holt *et al.*, 1994; Elliot and Facklam, 1995). Berdasarkan hasil tersebut diduga grup A identik dengan *Enterococcus faecalis*.

Grup B terdiri dari 2 isolat, mempunyai bentuk kokus, Gram positif, katalase negatif, tidak menghasilkan gas, mampu memfermentasi glukosa, manitol, sukrosa, laktosa, tumbuh pada suhu 10°C, tidak mampu tumbuh pada suhu 45°C dan NaCl 6,5%. Berdasarkan hasil tersebut diduga grup B identik dengan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Genusnya ditentukan berdasarkan bentuk sel kokus, mampu tumbuh pada suhu 10°C tetapi tidak mampu tumbuh pada suhu 45°C dan 6,5% NaCl (Rahayu, 2004). Ketidakmampuan sel untuk tumbuh pada suhu dan konsentrasi garam tersebut menjadi kunci pembeda dari genus *Enterococcus*. Kunci determinasi

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dari anggota kelompoknya adalah kemampuan memfermentasi laktosa, mannitol dan sorbitol. Walaupun didalam *Bergey's manual* spesies ini disebutkan tidak mampu menghasilkan asam dari manitol, namun beberapa literatur menyebutkan bahwa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mampu memfermentasi manitol tergantung strainnya (Urbach *et al.*, 1997; Ennahar, *et al.*, 2003; El Soda *et al.*, 2003). Hal ini diperkuat dengan penelitian Kimoto *et al.*, 2004 dimana seluruh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* yang

diisolasinya dari tanaman mampu memfermentasi manitol.

Grup C terdiri dari 2 isolat, mempunyai bentuk batang, Gram positif, katalase negatif, tidak menghasilkan gas, mampu memfermentasi glukosa, manitol, sukrosa, laktosa, sorbitol, rafinosa, salisin, tumbuh pada suhu 10°C dan suhu 45°C. Berdasarkan hasil tersebut diduga grup C identik dengan *Lactobacillus plantarum*. Genusnya ditentukan berdasarkan bentuk sel batang (Lucke and Schillinger, 1987; Rahayu, 2004), sedangkan kunci identifikasi *Lactobacillus plantarum* dari anggota kelompoknya adalah mampu menghasilkan asam dari rafinosa yang jarang dimiliki oleh *Lactobacillae* lainnya serta mampu memfermentasi sorbitol (Lucke and Schillinger, 1987; Elliot and Facklam, 1995). *Lactobacillus plantarum* sering ditemui pada jaringan tanaman walaupun tidak sedominan bakteri asam laktat kokus seperti *Leuconostoc*, *Enterococcus*, dan *Lactococcus*. *Lactobacillus plantarum* merupakan spesies yang paling tahan asam dan paling besar menghasilkan asam dibandingkan bakteri asam laktat yang lain (Steinkraus, 1983; Molin, 2003).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Bakteri asam laktat ditemukan pada buah belimbing wuluh. Tiga spesies bakteri asam laktat yang teridentifikasi adalah *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan *Lactobacillus plantarum*.

### Saran

Perlu dilakukan metode isolasi dan identifikasi yang berbeda untuk mengkonfirmasi spesies bakteri asam laktat yang terdapat pada belimbing wuluh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alexandre, S.K and D. Strete. 2001. *Microbiology A Photographic Atlas for The Laboratory*. An Imprint of Addison Wesley Longman Inc, New York.
- Anonim. 2006. *Belimbing Wuluh*. <http://www.ixoranet.com> Tanggal akses : 25 Agustus 2006.

- Cappucino, J.G. and N. Sherman. 1987. *Microbiology : A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. The Benyamin/Cummings Publ.Co.Inc, New York.
- Djamaran, I dan Yuniar, 1996. Kajian Pemberian Nilai Tambah serta pendirian industri Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L). *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 6 (2): 87-94.
- El Soda, M., N. Ahmed., N. Omran., G. Osman and A. Morsi. 2003. Isolation, Identification and Selection of Lactic Acid Bacteria Cultures for Cheesemaking. <http://www.cfs.uaeu.ac.ae/research/ejas.html>. *Emir. J. Agric. Sci*, 15 (2): 51-71.
- Ennahar, S., Y. Cai and Y. Fujita. 2003. Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1): 444-451.
- Facklam, R and J.A. Elliot. 1995. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram Positive Cocci, Excluding The Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology*, 8 (4) : 479-495.
- Fardiaz, S., B.S.L. Jenie dan A. Solihati. 1997. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat yang Bersifat Antimikroba dari Saurkraut. *Bul.Tek. dan Industri Pangan*, 8 (3): 13-21.
- Holt, J.G., N.L. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> Edition. Williams and Wilkins, Maryland, USA.
- Holzappel, W.H. and B.J.B.Wood. 1995. Lactid Acid Bacteria in Contemporary Perspective. Di dalam *The Genera of Lactid Acid Bacteria*. Wood, B.J.B. and W.H. Hozzapfel. Blackie Academic & Professional, London.
- Kimoto, H., M. Nomura., M. Kobayashi., T. Okamoto and S. Ohmomo. 2004. Identification and Probiotic Characteristics of Lactococcus Strains from Plant Materials. <http://www.jircas.affrc.go.jp>. *JARQ* 38 (2): 111-117.
- Koneman, E.W., S.D. Allen., V.R. Dowell., W.M. Janda., H.M. Sommers and W.C. Winn. 1988. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Leveau, J.Y, M. Bouix, and H. Roissart (1995). The Lactic Microflora. Di dalam *Microbiological Control for Foods and Agricultural Product*. Bourgeois C.M. dan Leveau, J.Y. VCH Publishers Inc, New York.
- Lucke, F.K and U.Schillinger. 1987. Identification of Lactobacilli from Meat and Meat Products. *Food Microbiology* 4: 199-208.
- Manan, H.A. 2002. *Belimbing Wuluh*. Harian Suara Merdeka, 20 April 2002.
- Moir, C.J., C.A. Kabilafkas., G. Arnold., B. M. Cox., A. D. Hocking and I. Jenson. 2001. *Spoilage of Processed Food: Causes and Diagnosis*. Food Microbiology Group. AIFT Inc (NSW Branch), New South Wales.
- Molin, G. 2003. The Role of Lactobacillus plantarum in Foods and in Human Health. Di dalam *Handbook of Fermented Functional Food*. CRC Press.
- Muzaifa, M. 2008. *Perubahan karakteristik fisikokimia asam sunti selama proses fermentasi*. Proposal Penelitian. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Rahayu, E.S., A.K Wardani dan S. Margino. 2004. Skrining Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin dari Daging dan Produk Olahannya. *Agritech*, 24 (2): 74-78.
- Roy, S.K and G.D. Joshi. 1995. Minor Fruits-Tropical. Di dalam *Handbook of Fruit Science and Technology*. Marcell Dekker Inc, New York.
- Savadogo, A, C., C.A.T Ouattara., P.W. Savadogo., N. Barro and A.S. Trarore. 2004. Microorganism Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (2): 134-139.

- Sharpe, M.E. 1979. Identification of The Lactic Acid Bacteria. Di dalam *Identification Methods for Microbiologist*. Skinner F.A and Lovelock, D.W. Academic Press, London.
- Steinkraus, K.H. 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Food*. Marcell Dekker, Inc. New York.
- Wibowo, D. 1989. Bakteri Asam Laktat. Di dalam *Mikrobiologi Pangan*. Sudarmadji, S. dkk. Proyek Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas (Bank Dunia XVII)-PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Urbach, E., B. Daniels., M.S. Salama., W. Sandine and S. J. Giovannoni. 1997. The *ldh* Phylogeny for Environmental Isolates of *Lactococcus lactis* Is Consistent with rRNA Genotypes but Not with Phenotypes. *Applied And Environmental Microbiology*, 63 (2) : 694-702.

