

SUKSESI BAKTERI ASAM LAKTAT PADA MANISAN BUAH PAKOBA (*Syzygium luzonense*)

SUCCESSION OF LACTIC ACID BACTERIA ON CANDIED PAKOBA FRUIT (*Syzygium luzonense*)

Patricia Pericilia Kembuan¹, Yermia Samuel Mokusuli², Helen J. Lawalata³, Emma Moko⁴,
Verawati I. Y. Roring⁵

¹Universitas Negeri Manado
Jl. Kampus Unima, Tonsaru,
Tondano Selatan, Minahasa,
Indonesia
kembuanpatris@gmail.com

²Universitas Negeri Manado
Jl. Kampus Unima, Tonsaru,
Tondano Selatan, Minahasa,
Indonesia
yermiasemuel@gmail.com

³Universitas Negeri Manado
Jl. Kampus Unima, Tonsaru,
Tondano Selatan, Minahasa,
Indonesia
lawalata_helen@yahoo.com

⁴Universitas Negeri Manado
Jl. Kampus Unima, Tonsaru,
Tondano Selatan, Minahasa,
Indonesia
emmamoko@unima.ac.id

⁵Universitas Negeri Manado
Jl. Kampus Unima, Tonsaru,
Tondano Selatan, Minahasa,
Indonesia
veraroring@unima.ac.id

ABSTRACT

*Pakoba fruit is often made into sweets, salad, pickles because it has a very sour taste and is a habitat for lactic acid bacteria. The purpose of this study was to determine the characteristics of lactic acid bacteria succession during the fermentation process of candied pakoba fruit. This research is an explorative research. The number of microbes was observed starting from day 0, 1, 3 and 7. Based on the results of identification data, 12 bacterial isolates were obtained in pakoba fruit fermentation. The isolates obtained were then macroscopically identified and microscopically identified. 12 isolates were round, 12 isolates had enpitire edges, 12 isolates had raised elevations, 12 isolates had covex colony surfaces, 10 isolates were white and 2 isolates were cream-colored. Of the 12 isolates, it was found that the bacteria that grew in the fermentation of candied pakoba fruit after profile matching was suspected of the genus *Lactobacillus* sp. and *Leucunostoc*.*

Keywords : *Bacterial Succession, Fermentation, Pakoba Fruit*

1. PENDAHULUAN

Sulawesi Utara dikenal dengan keunikan flora dan fauna, termasuk buah Pakoba (*Syzygium luzonense*), yang memiliki rasa asam khas dan sering digunakan dalam manisan. Buah ini mengandung asam palmitat, oleat, linoeat, serta antioksidan, dan menjadi habitat bagi bakteri asam laktat (BAL) yang dapat memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat ^{[1][2]}. BAL digunakan dalam industri pangan untuk fermentasi, pengawetan, dan sebagai agen probiotik^{[3][4]}. Meskipun BAL telah banyak diisolasi dari produk lain seperti daging dan susu, penelitian mengenai isolasi BAL dari manisan Pakoba masih terbatas, meskipun buah-buahan lain juga potensial sebagai^[5]. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi, dan mempelajari sukseksi BAL selama fermentasi manisan Pakoba. Manfaatnya bagi penulis adalah menambah wawasan dan keterampilan penelitian, serta memberikan informasi bagi masyarakat tentang BAL pada manisan Pakoba.

2. KAJIAN PUSTAKA

Deskripsi Buah Pakoba (*Syzygium luzonense*)

Tumbuhan Pakoba, yang dikenal di Minahasa sebagai pakuwa, terdiri dari dua jenis: pakoba merah dan pakoba putih. Pakoba merah tumbuh di dataran rendah hingga ketinggian 500–600 meter di atas permukaan laut, dengan pohon besar, batang berkayu, dan daun rimbun. Kayunya berwarna coklat muda, kasar, padat, dan lenting. Buahnya berwarna merah, bulat tertekan, berkulit tipis, dan berdaging putih, dengan rasa asam. Daunnya panjang, hijau tua mengkilat, dan ujungnya runcing. Tumbuhan ini termasuk dalam genus *Syzygium*.



Gambar 1. Buah Pakoba (*Syzygium luzonense*)

(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Klasifikasi

Klasifikasi buah Pakoba *Syzygium luzonense* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Filum : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

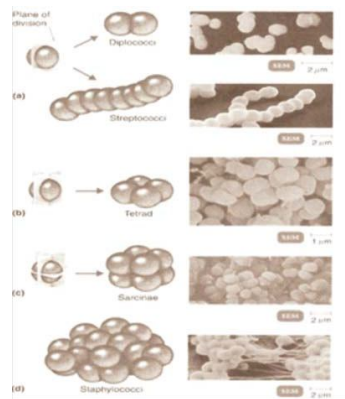
Ordo : Myrtales

Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah bakteri gram positif, katalase negatif yang memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat. Selnya berbentuk kokus, tidak bergerak, tidak berspora, dan anaerob fakultatif.^[6] BAL berperan dalam fermentasi pangan, menghasilkan asam yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk.^[3] BAL termasuk bakteri baik yang aman bagi manusia (GRAS) dan dapat digunakan sebagai agen probiotik.^[4] BAL memfermentasi glukosa melalui jalur glikolisis, menghasilkan asam laktat yang digunakan dalam pengawetan pangan dengan menurunkan pH dan menghambat mikroba pembusuk.^[7]

Morfologi Bakteri Asam Laktat

Ukuran sel bakteri biasanya berkisar antara 0,5 hingga 1,0 μm , dengan rentang diameter sel antara 0,2 hingga 2,0 μm dan panjangnya antara 2 hingga 8 μm .^[8] Sel bakteri patogenik memiliki ukuran antara 0,4 hingga 2 μm dan dapat terlihat menggunakan mikroskop cahaya atau elektron. Sel bakteri memiliki berbagai bentuk, salah satunya adalah kokus, yang berbentuk bulat seperti bola. Bentuk kokus dapat dikelompokkan berdasarkan jumlah koloni, antara lain monokokus (sel yang hidup menyendiri), diplokokus (berkelompok dua), streptokokus (berkelompok membentuk rantai), tetrad (berkelompok empat), stafilokokus (berkelompok tidak beraturan seperti buah anggur), dan sarcina (berkelompok membentuk kubus dari delapan sel atau lebih).^[9]



Gambar 2. Sel bakteri bentuk kokus^[8]

Bakteri berbentuk batang atau silinder disebut basil, yang terbagi menjadi basil tunggal (satu batang tunggal), diplobasil (berpasangan dua-dua), dan streptobasil (bergandengan membentuk rantai). Selain itu, ada bakteri berbentuk spiral, yang terbagi menjadi spiral (dengan tubuh kaku), vibrio (berbentuk koma dan dianggap spiral tak sempurna), dan spirocheta (spiral lentur yang memanjang dan mengerut saat bergerak).

Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh nutrisi, pH, suhu, oksigen, dan kelembaban.^[10] Bakteri membutuhkan energi dari cahaya (fototrof) atau senyawa kimia (kemotrof) dan memanfaatkan karbon, nitrogen, serta unsur logam untuk pertumbuhan. pH optimal bagi bakteri berkisar antara 6,5–7,5, meskipun beberapa bakteri dapat tumbuh di lingkungan asam atau alkali.^[11] Suhu memengaruhi aktivitas enzim; suhu rendah menurunkan aktivitas, sedangkan suhu tinggi menyebabkan denaturasi protein.^[10] Bakteri psikrofilik tumbuh pada suhu -5°C hingga 30°C .^[12] Mesofilik tumbuh optimal pada suhu 20°C hingga 40°C .^[11] Termofilik bertahan di suhu tinggi, dengan optimum 50°C hingga 60°C .^[12] Oksigen diperlukan sesuai jenis bakteri, seperti aerob, anaerob, atau mikroaerofilik.^[12] Kelembaban juga memengaruhi keseimbangan osmotik sel melalui mekanisme transport dan pengaturan internal.^[12]

Identifikasi Bakteri

Identifikasi adalah proses pengenalan, yaitu menempatkan objek dalam suatu kelas sesuai dengan karakteristik yang ada. Identifikasi mikroorganisme yang baru diisolasi sangat penting diperlukan adanya perincian, deskripsi, dan perbandingan secara jelas dengan deskripsi mikroorganisme yang telah dipublikasikan sebelumnya yang mempunyai kesamaan jenis. Identifikasi bakteri dilakukan dengan beberapa cara, yaitu secara morfologi, fisiologi, dan pengujian biokimia.

Uji Morfologi Bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dibedakan menjadi dua jenis: makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis mencakup karakteristik koloni seperti bentuk (circular, filamentous, irregular, rhizoid, spindle), permukaan (flat, raised, convex, umbonate), tepi (entire, lobate, undulate, serrate, filamentous, curled), serta warna koloni (keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan, atau hampir bening). Pengamatan mikroskopis meliputi pergerakan, pembelahan biner, serta bentuk dan ukuran sel, yang dapat berubah akibat fiksasi panas dan proses pewarnaan.^[13] Pewarnaan gram dilakukan untuk membedakan bakteri gram positif dan negatif, di mana dinding sel gram positif lebih

tebal dengan kadar lipid rendah, sedangkan gram negatif memiliki dinding sel kaya lipid.^[14] Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa gram positif mempertahankan warna ungu, sementara gram negatif berwarna merah.^[15]

Uji Fisiologis Bakteri

Pengamatan bakteri secara fisiologi dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri berdasarkan aktivitas selnya. Uji fisiologi bisa dilakukan dengan uji motilitas untuk mengetahui pergerakan bakteri.^[16] Pengamatan bakteri secara fisiologi adalah pengamatan yang dilakukan dengan beberapa uji biokimia.

Uji Biokimia

Pengamatan bakteri dengan uji biokimia bertujuan untuk mempelajari senyawa dalam tubuh bakteri, penyusun sel, dan interaksi kimianya.^[17] Uji biokimia digunakan untuk mengetahui sifat fisiologis koloni bakteri hasil isolasi, yang berkaitan dengan proses metabolisme sel bakteri. Identifikasi bakteri memerlukan pengetahuan tentang sifat fisiologis selain morfologi, karena bakteri dengan bentuk mirip dapat sulit dibedakan. Uji biokimia membantu menentukan spesies bakteri melalui reagen test.^[18]

Uji Sitrat

Uji sitrat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil negatif (-) ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru, sementara hasil positif (+) menunjukkan perubahan warna dari hijau ke biru, yang berarti bakteri menggunakan sitrat.^[19] Perubahan warna ini terjadi karena penggunaan sitrat oleh bakteri, yang menyebabkan peningkatan pH akibat penghilangan asam, sehingga media berubah warna.^[20]

Uji Motilitas

Uji motilitas digunakan untuk mengetahui pergerakan bakteri, yang dapat disebabkan oleh flagel (gerak aktif) atau gerak Brown akibat benturan antar molekul dalam medium.^[20] Hasil negatif (-) ditandai dengan pembentukan putih seperti akar yang menyebar pada bekas inokulasi, sementara hasil positif (+) menunjukkan penyebaran warna putih yang lebih luas di sekitar inokulasi, menandakan bakteri memiliki flagel dan dapat bergerak.^[18]

Uji Katase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim katalase, hasil uji positif ditandai dengan adanya gelembung udara atau busa ketika bakteri ditetesi larutan hidrogen peroksida (H₂O₂).^[21] Mengartikan bakteri menghasilkan enzim katalase yang merubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

Pewarnaan Endospora

Tujuan pewarnaan endospora untuk mengetahui apakah bakteri dapat menghasilkan endospora. Pengamatan terhadap spora bakteri dengan pewarna malachite green dan safranin, untuk mewarnai endospora yang ada dalam sel bakteri dan penggunaan safranin untuk memperjelas pengamatan sel vegetatif.^[22] Teknik ini menghasilkan warna hijau pada endospora positif.^[23] Genus bakteri yang membentuk endospora adalah genus bacillus dan genus clostridium.

Penelitian Terdahulu

Pada penelitian terdahulu oleh I wayan Sudiarta pada tahun 2011 dengan judul “*Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat indigenous dari kecap ikan lemuru (sardinella longiceps) selama fermentasi*” dengan kesimpulan Selama fermentasi kecap ikan lemuru telah berhasil diisolasi sebanyak 52 isolat BAL indigenous yang terdistribusi ke dalam enam kelompok berdasarkan perbedaan pertumbuhan pada suhu, pH dan konsentrasi garam yang berbeda. Dengan menggunakan perangkat kit API 50 CH berhasil diidentifikasi dua spesies BAL yaitu *Tetragenococcus halophilus* dengan empat strain: *T. halophilus* KI03, *T. halophilus* KI29, *T. halophilus* KI13, *T. halophilus* KI31 dan *Aerococcus viridans* dengan dua strain: *A. viridans* KI11 dan *A. viridans* KI18. Semua strain BAL tersebut telah menunjukkan dinamika suksesi pertumbuhan BAL indigenous selama fermentasi. Perubahan mikrobiologis dan biokimiawi terjadi selama fermentasi kecap ikan lemuru. Total BAL dan total khamir meningkat tajam setelah kecap ikan lemuru difermentasi selama 1 bulan, kemudian populasinya menurun dengan semakin lamanya fermentasi, sedangkan kapang tidak terdeteksi Nilai total asam dan kadar protein terlarut meningkat, sedangkan pH mengalami penurunan.^[24]

Kerangka Berpikir

Buah pakoba, dengan rasa khas dan aroma asam, sering digunakan dalam manisan, rujak, dan asinan. Mengandung asam palmitat, oleat, linoleat, dan antioksidan, buah ini diketahui dapat meningkatkan hipoksia tubular dan menjadi habitat bakteri asam laktat (BAL) karena keasamannya. BAL banyak digunakan sebagai kultur starter dalam fermentasi daging, susu, dan sayuran untuk meningkatkan cita rasa dan pengawetan. Dalam fermentasi pakoba, jenis BAL yang berkembang bervariasi tergantung produk, dan masih sedikit yang diketahui tentang mikroba dalam manisan pakoba. Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi BAL perlu dilakukan untuk mengetahui jenis yang terlibat dalam fermentasi serta suksesi BAL selama prosesnya (0,1,3,7 hari).

Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan tinjauan Pustaka, maka hipotesis dari penelitian ini dapat dirumuskan bahwa terdapat proses suksesi bakteri asam laktat dan perubahan biokimia selama proses fermentasi manisan buah Pakoba.

3. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, *hot plate* (biosan), timbangan analitik (AND), *autoclave* (Tomy), *incubator* (biosan), vortex, cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, jarum ose, pipet tetes, makropipet (physiocare), tip, mortar, Bunsen, mikroskop, *Laminar Air Flow* (biosan), gelas objek, penjepit gelas objek, botol semprot, *aluminium foil*, masker, kertas, kapas, tissue, dan sarung tangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah media *Simmons's Citrate Agar*, *men medium de men rogrosa sharpe Broth* (MRSB), *crystal violet*, larutan *iodine*, alkohol 96%, NaCl, hydrogen peroksida (H₂O₂), *malachite green*, spiritus dan sampel manisan buah Pakoba.

Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian telah dilakukan pada bulan Januari 2024 – Mei 2024 yang dimulai dengan pengambilan sampel di langowan dan selanjutnya sampel dibawa untuk dilakukan pengujian di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi FMIPAK Universitas Negeri Manado.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif kualitatif berbasis laboratorium dengan melakukan identifikasi bakteri secara morfologi, fisiologi, dan pengujian biokimia untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat pada manisan buah Pakoba (*Syzygium luzonense*).

Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian hanya terdiri satu variabel atau variabel tunggal. Variabel yang akan diamati yaitu suksesi bakteri asam laktat pada manisan Buah Pakoba.

Sampel

Sampel yang dalam penelitian ini adalah Fermentasi dari Manisan Buah Pakoba (*Syzygium luzonense*). Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *random sampling*, yaitu teknik pengambilan sampel secara acak atau sederhana. Kemudian sampel yang didapat diambil untuk dilakukan identifikasi bakteri.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Alat

Alat dan bahan yang akan digunakan dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

Preparasi Sampel

Buah Pakoba sebanyak 500 gram dicuci bersih, kemudian diblender halus dan dimasukkan ke dalam toples. Gula pasir dilarutkan dengan air, dimasak hingga mendidih, lalu didinginkan. Larutan gula dituangkan ke dalam toples berisi buah, memastikan semuanya terendam, kemudian diaduk hingga homogen dan ditutup rapat. Fermentasi dilakukan selama 7 hari, dengan pengambilan sampel pada hari ke-0, 1, 3, dan 7.

Isolasi Bakteri

Sebanyak 5 gram sampel manisan buah pakoba yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam 50 ml aquades steril, lalu diencerkan pada 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Hasil pengenceran dituang ke cawan petri berisi media MRSB + 1% CaCO₃, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 hari hingga terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri. Koloni yang memiliki morfologi dan zona bening berbeda diisolasi dan dimurnikan menggunakan medium MRS agar dengan metode streak kuadran hingga koloni terpisah.^[25]

Pemurnian Bakteri

Isolat yang diperoleh dari proses isolasi selanjutnya dilakukan pemurnian dengan cara menggosokkan isolat pada media MRSB yang baru menggunakan teknik *quadran streak*. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pembuatan Stok Bakteri Uji

Isolat murni bakteri yang telah didapatkan diperbanyak dengan menggunakan media MRSB dilarutkan dalam akuades Selanjutnya bakteri diinokulasikan dengan metode *streak* (gores), kemudian

diinkubasi selama 24 jam di suhu ruangan. Koloni bakteri yang telah tumbuh bisa digunakan sebagai stok bakteri selama proses penelitian.^{[26][27]}

Pewarnaan Garam

Untuk membuat apusan bakteri, gelas objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi label. Jarum ose disterilkan pada api bunsen, didinginkan, dan digunakan untuk mengambil kultur bakteri, yang kemudian diletakkan di tengah objek gelas yang sudah diberi akuades steril dan diratakan. Setelah dikeringkan, pulasan bakteri difiksasi dengan api Bunsen dan siap untuk pewarnaan. Sedangkan untuk pewarnaan Gram, teteskan crystal violet selama 1 menit, bilas dengan aquades, lalu teteskan iodine selama 1 menit dan bilas lagi. Dekolorasi dilakukan dengan alkohol 98% selama 30 detik, diikuti dengan safranin selama 1 menit dan pembilasan. Setelah dikeringkan, amati dengan mikroskop menggunakan minyak imersi pada perbesaran 100× dan catat bentuk sel serta sifat Gram-nya.

Pewarnaan Endospora

Biakan murni bakteri diambil satu jarum ose lalu disuspensikan dengan akuades di gelas objek. Preparat difiksasi di atas api bunsen. *Malachite green* diteteskan di atas preparat dan dibiarkan selama 10 menit di atas penangas air. Preparat diangkat, dibiarkan dingin dan dibilas dengan air mengalir. Tetesi Safranin sebanyak 1 tetes, dibiarkan 30 detik kemudian dicuci di air mengalir dan dikeringkan. Amati preparat dengan mikroskop. Hasil uji positif jika sel vegetatif berwarna merah adanya spora berwarna hijau.

Uji Biokimia

Uji Sitrat

Untuk pembuatan media uji, sebanyak 0,50 gram media Simmon's citrate agar ditimbang dan dilarutkan dalam 21 mL akuades di dalam erlenmeyer. Media kemudian disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit, dikeluarkan, dan didinginkan pada suhu ruang dengan posisi setengah miring hingga padat. Langkah selanjutnya, isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose dan ditusukkan hingga $\frac{3}{4}$ bagian media, kemudian digores pada bagian miring media. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam.

Uji Motilitas

Untuk pembuatan media uji motilitas, media MRSB dicampurkan dengan 75% agar-agar sehingga menghasilkan tekstur semi-solid.^[20] Langkah selanjutnya, isolat yang telah dimurnikan diambil sebanyak satu ose dan digoreskan pada media agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam.

Uji Katalase

Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose secara aseptik dan diletakan diatas kaca preparat. Selanjutnya H₂O₂ 3% diteteskan sebanyak 1-2 tetes ke atas kaca preparat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung yang bererati ada pembentukan gas oksigen (O₂) yang merupakan hasil pemecahan H₂O₂ oleh enzim katalase. Bakteri asam laktat termasuk bakteri negatif sehingga hasil dari uji katalase tidak akan membentuk gelembung udara.^[28]

Uji Produksi Gas

Uji produksi gas dari glukosa dilakukan untuk mengetahui BAL tersebut bersifat homofermentatif atau heterofermentatif. Kedalam tabung reaksi yang berisi tabung durham diisi 5 ml media MRS Broth. Diinokulasikan satu ose isolat BAL, kemudian diinkubasikan aerob pada inkubator bersuhu 37°C selama 24-48 jam. Apabila positif terbentuk CO₂ maka pada tabung durham terlihat gelembung gelembung udara, dan media berubah warna menjadi kuning.

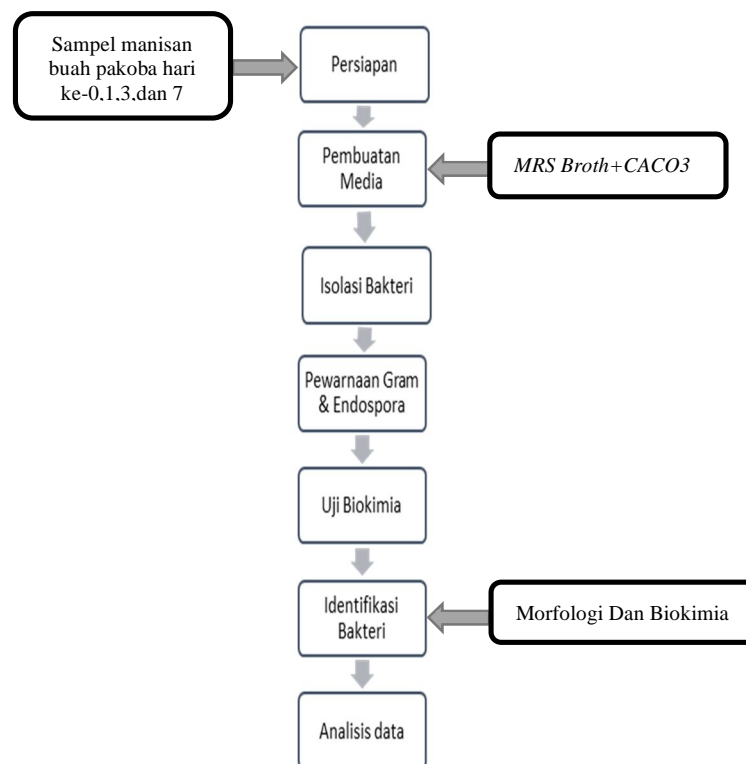
Penentuan Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan mempergunakan pH paper (NESCO), selanjutnya pH paper dicelupkan kedalam sampel manisan buah pakoba dan diunggu 1 menit sampai pH paper berubah warna.

Identifikasi

Identifikasi bakteri dilakukan dengan buku identifikasi bakteri dari Holt, dkk dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th*. (2004).^[29]

Diagram Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram Alur penelitian

Analisis Data

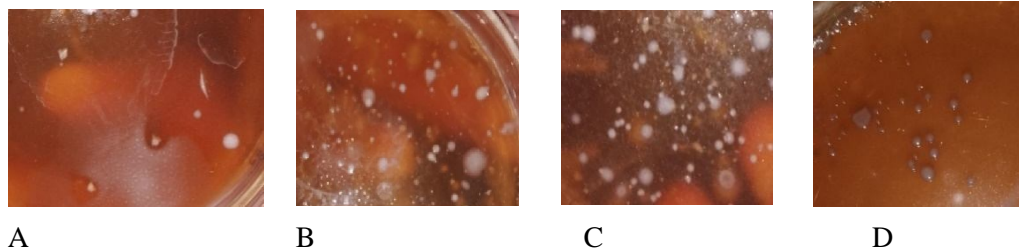
Data-data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif yang disajikan dalam bentuk tabel dan paragraf dengan melakukan identifikasi bakteri meliputi karakteristik makroskopik yang terdiri dari bentuk serta warna koloni, dan karakteristik mikroskopis yang dapat diamati meliputi bentuk sel, dan pewarnaan dari isolat bakteri yang diperoleh secara morfologi dan pengujian biokimia untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat pada fermentasi manisan buah pakoba.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dari manisan buah pakoba selama fermentasi 7 hari dilakukan menggunakan teknik pour plate dengan pengenceran hingga seri 10^{-7} untuk mengurangi jumlah mikroba tersuspensi, kemudian diinokulasikan pada media MRSA + CaCO_3 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 hari^{[30][31]}. Isolasi ini menghasilkan 12 koloni bakteri penghasil asam, ditandai dengan zona jernih di sekitar koloni sebagai hasil reaksi kimia antara asam organik yang dihasilkan BAL dan CaCO_3 . Media MRSA memfasilitasi pertumbuhan BAL dan pelepasan metabolit sekundernya



Gambar 4. Isolasi bakteri pada fermentasi manisan buah pakoba, A. Isolasi hari-0, B. Isolasi hari-1, C. Isolasi bakteri hari ke-3, D. Isolasi bakteri hari ke-7.

Selama fermentasi manisan buah pakoba, terjadi perubahan pH yang mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas mikroba, dengan BAL tumbuh optimal pada pH 5,5-5,8.^[32] Pengukuran pH dan perhitungan jumlah koloni bakteri membantu memantau suksepsi mikroba selama fermentasi. Hasil pengukuran pH terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Perubahan pH pada fermentasi manisan buah pakoba selama 4 hari fermentasi

Sampel	Nilai pH
MP ₀ (hari 0)	6
MP ₁ (hari 1)	5
MP ₃ (hari 3)	5
MP ₇ (hari 7)	5

Selama fermentasi manisan buah pakoba, pH turun dari 6 pada hari ke-0 menjadi 5 pada hari ke-1, ke-3, dan ke-7 (Tabel.1). Koloni bakteri dihitung menggunakan *Standart Plate Count* (SPC), dengan pelaporan dua digit angka. Jika koloni <30 , hanya pengenceran terendah dilaporkan, misalnya 35 koloni ditulis sebagai $3,5 \times 10^5$ CFU/g. Data hasil perhitungan terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Koloni Mikroba pada fermentasi manisan buah pakoba selama 4 hari fermentasi

Sampel	Jumlah rata-rata pertumbuhan
MP ₀ (hari 0)	$1,3 \times 10^5$ CFU/g
MP ₁ (hari 1)	$1,9 \times 10^5$ CFU/g
MP ₃ (hari 3)	$13,0 \times 10^5$ CFU/g
MP ₇ (hari 7)	$16,4 \times 10^5$ CFU/g

Selama proses fermentasi manisan buah pakoba menunjukkan adanya pola suksesi bakteri seperti pada gambar 5, pada fermentasi hari-0 kondisi pH bakteri berada pada pH 6 dengan total populasi mikroba sebanyak $1,3 \times 10^5$ CFU/g, kemudian pada hari-1 kondisi pH mengalami penurunan berada pada pH 5 namun total populasinya mengalami peningkatan yaitu $1,9 \times 10^5$ CFU/g, pada hari-3 total populasinya semakin meningkat yaitu $13,0 \times 10^5$ CFU/g dengan kondisi pH 5 dan puncaknya pada hari ke-7 jumlah koloni $16,4 \times 10^5$ CFU/g pada pH 5, penurunan pH terjadi karena di pengaruhi oleh jumlah dan aktivitas dari bakteri asam laktat dalam fermentasi manisan buah pakoba. Selama fermentasi manisan buah pakoba, terjadi suksesi bakteri yang memengaruhi pH dan populasi mikroba. Pada hari ke-0, pH 6 dengan populasi $1,3 \times 10^5$ CFU/g. Pada hari ke-1, pH turun menjadi 5, sementara populasi naik menjadi $1,9 \times 10^5$ CFU/g. Hari ke-3, populasi meningkat lagi menjadi $13,0 \times 10^5$ CFU/g pada pH 5, dan mencapai puncak pada hari ke-7 dengan populasi $16,4 \times 10^5$ CFU/g pada pH yang tetap 5. Penurunan pH disebabkan oleh aktivitas bakteri asam laktat.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan Bakteri dan perubahan pH pada proses fermentasi manisan buah pakoba (0,1, 3,7 hari)

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Berdasarkan hasil isolasi bakteri pada Fermentasi Manisan Buah Pakoba terdapat 12 isolat yang berhasil dipisahkan dan diberi label MP_0 (Manisan Pakoba hari ke-0), MP_1 (Manisan Pakoba hari ke-1), MP_3 (Manisan Pakoba hari ke-3), MP_7 (Manisan Pakoba hari ke-7). Kemudian dilakukan pengamatan karakteristik morfologi bakteri disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Morfologi koloni bakteri yang diperoleh selama fermentasi manisan buah pakoba (*Syzygium luzonense*) (hari 0,1,3 dan 7)

NO	Kode Isolat	Morfologi		Koloni		
		Bentuk	Elevasi	Tepian	Permukaan koloni	Warna
1	MP ₀ (2)	Circular	Raised	Entire Entire	Convex	Krem
2	MP ₀ (3)	Circular	Raised	Entire	Convex	Krem
3	MP ₁ (1)	Circular	Raised	Entire	Convex	Krem
4	MP ₁ (2)	Circular	Raised	Entire	Convex	Krem
5	MP ₁ (3)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
6	MP ₃ (2)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
7	MP ₃ (3)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
8	MP ₃ (4)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
9	MP ₇ (1)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
10	MP ₇ (2)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
11	MP ₇ (3)	Circular	Raised	Entire	Convex	Putih
12	MP ₇ (4)	Circular	Raised		Convex	Putih

*) : MP₀: Manisan pakoba hari 0; MP₁: Manisan pakoba hari 1; MP₃ Manisan pakoba hari 3; MP₇: Manisan pakoba hari 7: Circular (bulat), Raised (Terangkat), Entire (Licin/Rata), Convex (Cembung),putih.

Hasil pengamatan morfologi koloni pada Tabel 3, terdapat 12 isolat bakteri yang memiliki warna putih, 4 isolat berwarna krem. Bentuk koloni bulat, elevasi terangkat, tepian rata. Selanjutnya untuk mengetahui jenis dari 16 isolat bakteri tersebut, maka dilakukan *profile matching* berdasarkan hasil uji biokimia yang telah dilakukan seperti pada tabel 4.

Tabel 4. *Profile matching* isolat bakteri asam laktat pada manisan buah pakoba (*Syzygium luzonense*) (hari 0,1,3,dan 7).

NO	Kode Isolat	Bentuk sel	Gram	Spora	Sitrat	Motilitas	Katalase	Gas	Jenis bakteri
1	MP ₀ (2)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
2	MP ₀ (3)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
3	MP ₁ (1)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
4	MP ₁ (2)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
5	MP ₁ (3)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
6	MP ₃ (2)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
7	MP ₃ (3)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
8	MP ₃ (4)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
9	MP ₇ (1)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
10	MP ₇ (2)	Coccus	+	-	-	-	-	+	<i>Leuconostoc</i> sp.
11	MP ₇ (3)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
12	MP ₇ (4)	Basil	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.

Ket*)Basil: Batang ; Coccus: Batang

Berdasarkan *profile matching* yang telah dilakukan didapatkan bahwa bakteri yang terdapat pada fermentasi manisan buah pakoba diduga dari genus *Lactobacillus* sp. dan *Leuconostoc* sp.

Pembahasan

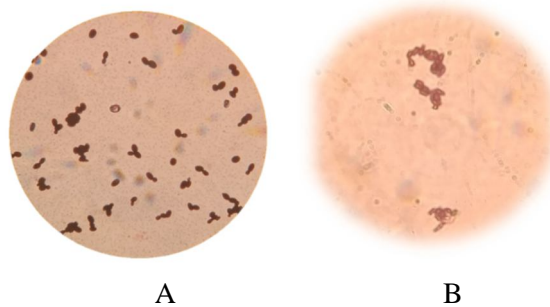
Suksesi Pertumbuhan Bakteri

Perubahan pH dan pertumbuhan mikroba selama fermentasi manisan buah pakoba menunjukkan adanya perbedaan aktivitas mikroba. Pada hari ke-0, pH lingkungan 6 mendukung pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dengan populasi $1,3 \times 10^5$ CFU/g, sesuai kisaran optimal pH 5,5-6,2.^{[33][34]} Pada hari ke-1, pH turun menjadi 5 akibat pembentukan asam, tetapi populasi meningkat menjadi $1,9 \times 10^5$ CFU/g, mendukung pertumbuhan *Leuconostoc sp.* yang optimal pada pH 5.^[35]

Pada hari ke-3, pH tetap 5, dan pertumbuhan meningkat menjadi $13,0 \times 10^5$ CFU/g karena ketersediaan nutrisi yang mendukung *Leuconostoc sp.*^[36] *Lactobacillus sp.* kemungkinan tidak terdeteksi akibat penipisan nutrisi. Pada hari ke-7, populasi melonjak menjadi $16,4 \times 10^5$ CFU/g dengan kondisi pH tetap 5, didukung oleh adaptasi bakteri, peningkatan nutrisi, dan penurunan kompetisi.^[37] *Lactobacillus sp.* dan *Leuconostoc sp.* memanfaatkan gula sebagai sumber karbon, menghasilkan energi untuk pertumbuhan.^[38]

Pewarnaan Gram

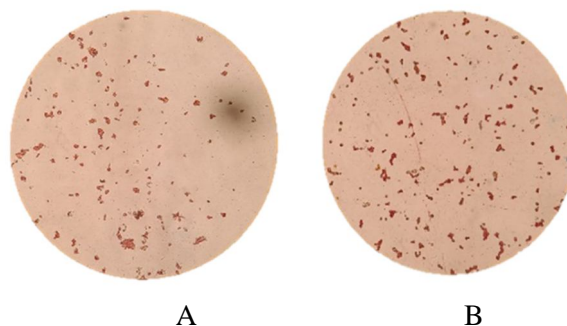
Pewarnaan gram pada 12 isolat bakteri menunjukkan semua isolat bersifat gram positif, ditandai dengan warna ungu dan bentuk basil (Gambar 5). Pewarnaan gram bertujuan membedakan bakteri gram positif dan negatif^[41] Gram positif memiliki dinding sel tebal berisi peptidoglikan yang mempertahankan warna ungu dari kristal violet meskipun dicuci dengan alkohol-lugol, sehingga tidak menyerap pewarna safranin dan tetap ungu.^[39]



Gambar 6. Hasil Pewarnaan Gram, A. Isolat MP₃, B. Isolat MP₁

Pewarnaan Endospora

Bakteri yang berwarna hijau menunjukkan kemampuan menghasilkan spora karena mengikat pewarna malachite green yang menembus dan bertahan di endospora meski dibilas dengan air. Sebaliknya, bakteri non-spora akan kehilangan warna hijau dan mengikat pewarna merah safranin. Hasil penelitian menunjukkan 16 isolat berwarna hijau, menandakan kemampuan menghasilkan spora.



Gambar 7. Pewarnaan endospora. A. Isolat MP₁(4), B. Isolat MP₃(3)

Uji Biokimia

Uji Sitrat

Uji sitrat merupakan uji yang digunakan untuk melihat kemampuan dari bakteri untuk memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Uji sitrat akan menunjukkan bahwa uji sitrat positif jika terjadi perubahan warna pada media artinya bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan energi, jika uji sitrat negatif artinya bakteri tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan energi^[19]. Pada hasil penelitian 12 isolat menunjukkan hasil negatif dikarenakan media tidak mengalami perubahan warna dimana media tetap berwarna hijau.

Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Motilitas bakteri disebabkan karena adanya flagel (gerak aktif) atau karena faktor dari luar (gerak Brown).^[39] Dari hasil yang didapat menunjukkan bahwa 12 isolat bakteri merupakan motil karena tidak tumbuh disekitar tusukan.

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan enzim katalase dan pada hasil penelitian 12 isolat menunjukkan hasil positif, hasil uji positif ditandai dengan adanya gelembung udara atau busa ketika bakteri ditetesi larutan hidrogen peroksida (H₂O₂).^[21]

Uji Produksi Gas dari Glukosa

Hasil uji produksi gas terdapat 6 isolat positif atau menghasilkan gelembung dan 6 isolat yang tidak menghasilkan gelembung. Uji produksi gas bertujuan untuk melihat aktivitas metabolisme BAL, dimana dikelompokkan menjadi dua tipe fermentasi jika menghasilkan gelembung maka tipe fermentasi homofermentatif dan jika tidak menghasilkan gelembung tipe fermentasi heterofermentasi.^[40]

5. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa Terjadi Proses sukseksi bakteri pada Fermentasi Manisan buah Pakoba. Semakin lama proses fermentasi maka pertumbuhan bakteri akan semakin bertambah, Bakteri yang berperan dalam sukseksi fermentasi buah Pakoba adalah *lactobacilus sp* dan *leuconostoc*. Dengan adanya penelitian ini, kiranya dapat dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dengan bakteri yang terdapat pada fermentasi Manisan Buah Pakoba.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, arahan, dan bantuan dalam penyusunan penelitian ini. Penulis menyadari bahwa karya ini masih memiliki kekurangan, oleh karena itu, masukan dan saran konstruktif dari para pembaca sangat diharapkan guna penyempurnaan di masa mendatang. Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan dapat digunakan sebagai referensi bagi penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Detha, A., Datta, F. U., Beribe, E., Foeh, N., & Ndaong, N. (2019). *Karakteristik Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Susu Kuda Sumba*. Jurnal Kajian Veteriner, 7(1), 85-92.

- [2] Walean M, Rumondor R, Maliangkay H.P, dan Melpin R. 2018. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Batang Pakoba (Syzygium sp.) Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih Yang Diinduksi Etilen Glikol*. *Chem. Prog.* 11 (1).
- [3] Smid, E. J. dan Gorris. L. G. 2007. *Natural antimicrobials for food preservation*. In: M. S. Rahman (Ed.). *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. CRC Press, New York
- [4] Surono, I. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*, PT. Zitri Cipta Karya: Jakarta. *Teknologi dan Industri Pangan*, 7(2) : 46-5.
- [5] Mirza Nuryady, M., Istiqomah. T., Faizah. R., Ubaidillah, S., Mahmudi. Z., Sutoyo. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Yoghurt*. *J. UNEJ*. 2013, I (5): 1-11.
- [6] Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology, Third Edition*. CRC Press LLC Boca Raton, Florida.
- [7] Aryanta, I W. R. 2007. *Peranan Bakteri Asam Laktat Dalam Industri Pengolahan Bahan Pangan*. *Prosiding Orasi Ilmiah Guru Besar Universitas Udayana tahun 1991 – 2005*. Badan Penjaminan Mutu Universitas Udayana, Denpasar.
- [8] Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2010. *Microbiology : An Introduction. 10th ed.* California : Benjamin & Cummings
- [9] Boleng, D. T. (2015). *Bakteriologi Konsep-Konsep Dasar*.
- [10] Pahmawati, Y. 2011. *Mengenal Bakteri*. Jakarta : Adfale Prima Cipta
- [11] Pelezar M., Chan, E. C. S. 2006. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press
- [12] Wibowo, M.S. 2012. *Pertumbuhan dan kontrol bakteri*. *Jurnal pertumbuhan bakteri*
- [13] Putri L.O. Adde & Endang Kusdiyantini. 2018. *Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjual belikan di Maluku-Indonesia*. 1(6-12)
- [14] Cappuccino. J. C, Sherman. N. 2005. *Microbiology-A laboratory Manual. 6th Ed.*, Singapore: Pearson Education.
- [15] Imtiyaz Nuha Arifah dan Bernadetta Octavia. 2023. *Identifikasi Bakteri Pada Bintil Akar Aktif Dan Tidak Aktif Serta Rhizosfer Kacang Tanah*. *Jurnal Kingdom The Journal Of Biological Studies*
- [16] Kosasi, C., Lolo, W. A., & Sudewi, S. (2019). ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN ALGA *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh SERTA IDENTIFIKASI SECARA BOKIMIA. *PHARMACON*, 8(2), 351. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29301>
- [17] Murray. 2005. *Buku Ajar Mikrobiologi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
- [18] Handayani, Ekowati, dan Pakpahan. *Karakterisasi Fisiologi dan Pertumbuhan Isolat Bakteri Bacillus thuringiensis dari Tanah Naungan di Lingkungan Universitas Lampung*. 2013.
- [19] Manalu Trijuliamos Rosario, Saiful Bahari, Melisa, Siti Sarah. 2020. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal Feses Manusia sebagai Antibakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus*. *Jurnal ilmu kefarmasian*.
- [20] Ulfa, A., Suarsini, E., dan Henie, M. (2016). *Isolasi dan Uji Sensitivitas Merkuri pada Bakteri dari Limbah Penambangan Emas di Sekotong Barat Kabupaten Lombok Barat : Penelitian Pendahuluan Isolation and Mercury Sensitivity Test of Bacterias Isolated from Waste Disposal in Gold Mining Area in West Sekotong of West Lombok Region : Preliminary Study*. 13(1), 793–799.
- [21] Midali Khairunnisa. (2018). *Isolasi dan Identifikasi Staphylococcus aureus pada Ambing Kambing Peranakan Etawa (PE)*. *JURNAL ILMIAH MAHASISWA VETERINER*, 2(4), 538–545.
- [22] Zaidah D. 2013. *Isolasi, karakterisasi dan potensi bakteri aerob sebagai pendegradasi limbah organik*. *Jurnal sains dan seni ITS*, 2(1)

- [23] Fitrah, I. D., Darmawi, dan Rasmaidar. (2013). Isolasi *Pasteurella multocida* pada kuda dan sesivitasnya terhadap antibiotik. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7: 121-125.
- [24] Sudiarta, I Wayan. 2011. *Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat indigenous dari kecap ikan lemuru (sardinella longiceps) selama fermentasi*. Universitas Udayana
- [25] Sarkono, L. S., & Rahayu, E. S. (2006). Isolasi, seleksi, karakterisasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dari berbagai buah masak. *Sains dan Sibernatika*, 19(2006).
- [26] Lawalata, H.J Dan Satiman, U. 2015. *Identification Of Lactic Acid Bacteria Proteolytic Isolated From An Indonesian Traditional Fermented Fish Sauce Bakasang by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)*. *Int. Journal of ChemTech Research*. 8 (12) pp 630-636.
- [27] Lawalata, H. J., Rengkuan, M. D., dan Howan, D. H. O. (2018). *Identifikasi Fenotipik dan Genotipik Bakteri Asam Laktat Penghasil Antibakteri Dari Buah Langsung (Lansuium domesticum) Matang*.
- [28] Hairunnisa & Sari, R. 2019. Identifikasi bakteri asam laktat (BAL) penghasil bakteriosin dari makanan botok ikan tongkol (*Euthynnus affinis* C.) khas Kalimantan Barat yang memiliki aktivitas terhadap bakteri patogen. *Jurnal Untan*, 4(1), 1-8
- [29] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., & Wiliam, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. New York: Lippincott William and Wilkins.
- [30] Rimadhini FN, Sumardianto, dan Romadhon, 2020. *Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Rusip Ikan Teri (Stolephorus sp.) dengan Konsentrasi Gula Aren Cair yang Berbed*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*; 2(1): 54–63.
- [31] Rosmania dan Fitri Yanti. 2020. *Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri*. *Jurnal Penelitian Sains*; 22(2):76-86
- [32] Khalid, K. 2011. *An overview of lactic acid bacteria*. *International Journal of Biosciences (IJB)* 1 (3): 1-13.
- [33] Slizewska Katarzyna dan Agnieszka C,W. 2020. *Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium*. National Lybrary of Medicine.
- [34] Lawalata, H. J., Jenny Kumajas, Soenandar M. Tengker, Kharly M. Runtuwene, Revanda S. Hasani and Megawati M. Weken. 2023. *Lactic Acid Bacteria as an Exopolysaccharides (EPS) Producing Starter from Pakoba Fruit (Syzygium sp.), Endemic Species at Minahasa, North Sulawesi*.
- [35] Sari, R. A., Nofiani, R. dan Ardinarsih, P., 2012. *Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Genus Leuconostoc dari Pekasam Ale-Ale*. *Jkk*, Volume 1(1), Pp. 14-20
- [36] Yelnetty A, W Maaruf, R. Hadju, dan D. Rembet. 2023. *Pengaruh penggunaan jambu biji merah terhadap pH, Total bakteri Asam Laktat, kadar alkohol dan viskositas kefir*. *Fakultas Peternakan Universitas Sam Ratulangi Manado*, 95115
- [37] Mulyani Sri, K.M.F. Sunarko dan B. E. Setiani. 2023. *Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Total Asam, Total Bakteri Asam Laktat dan Warna Kefir Belimbing Manis (Averrhoa carambola)*. *Jurnal Ilmiah Sains*
- [38] Koesoemawardani D., S. Rizal, M. Tauhid. 2013. *Perubahan sifat mikrobiologi dan kimiawi rusip selama fermentasi*. *Agritech* 33(3) : 265-272. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian, Universitas Lampung
- [39] Azara Izmi, Muhamad Rais, Andi, S, Reski, P.P. 2022. *Isolasi Dan Identifikasi Asam Laktat Pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta Asal Bantaeng*. *Jurnal Teknologi Pertanian*, Vol.23.No 1.

- [40] Amalia Zahra Nur.2016. *isolasi dan karakteristik bakteri asam laktat dari limbah cair rendaman kacang kedelai*. UIN Syarif Hidayatullah jakarta
- [41] Simajuntak Suddin dan Yermia S. Mokosuli.2018. *Isolation and Identification of Thermophilic Bacteria, Producer of Amylase Enzyme, from Lake Linow, North Sulawesi*. Journal of Pure and Applied Microbiology