



ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI MADU HITAM SUMBAWA DAN POTENSINYA SEBAGAI SENYAWA ANTIMIKROBA

Baso Manguntungi ^{1)*}, Arlinda Puspita Sari ²⁾, Ariandi ²⁾, Riri Rimbun Anggih Chaidir¹⁾, Izzul Islam¹⁾, Lili Suharli¹⁾, Leggina Rezzy Vanggy¹⁾, Naning Sufiyanti¹⁾, Muhammad Fajri Al Fateeh¹⁾, Ulfa Febiana Whatin¹⁾, Intan Dwi Pratiwi¹⁾, Widya Dwi Kusuma¹⁾

¹Program Studi Bioteknologi, Universitas Teknologi Sumbawa, Sumbawa, Indonesia

²Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Sulawesi Barat, Majene, Indonesia

e-mail: baso.manguntungi@uts.ac.id

Abstrak

Madu hitam merupakan salah satu ciri khas dari daerah Sumbawa yang dihasilkan oleh lebah jenis *Trigona spp.* Madu hitam memiliki rasa asam yang berbeda dari madu lainnya dan memiliki khasiat sebagai antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi bakteri asam laktat pada madu hitam sumbawa sebagai antimikroba. Diperoleh 20 isolat bakteri dari madu hitam sumbawa, 10 diantaranya merupakan isolat bakteri asam laktat. Metabolit sekunder dari 10 isolat bakteri asam laktat kemudian diuji dengan metode difusi agar atau sumur untuk melihat efektivitas bakteri sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella thypi* dan *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri gram negatif dan gram positif. Pengamatan uji antimikroba dilakukan pada jam ke-2, ke-4 dan ke-6. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari isolat bakteri asam laktat MD 1 memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. thypi* dan *S. aureus*.

Kata kunci: Madu hitam, bakteri asam laktat, antimikroba, metabolit sekunder

Abstract

Black honey is one of the characteristics of the Sumbawa region which is produced by *Trigona spp.* Black honey has a sour taste that is different from others' honey and has efficacy as an antibiotic. This research aims to examine the potential of lactic acid bacteria in Sumbawa black honey as an antimicrobial. 20 bacterial isolates were obtained from Sumbawa black honey, 10 of them were lactic acid bacteria isolates. Secondary metabolites from 10 LAB isolates were then tested by well or agar diffusion method to see the effectiveness of their antimicrobial activities against *Salmonella thypi*

and *Staphylococcus aureus* bacteria which representing the gram-negative and gram-positive bacteria. Antimicrobial test observations were carried out at the 2nd, 4th, and 6th hours. The results of antimicrobial tests showed that secondary metabolites form MD 1 lactic acid bacteria isolate had an excellent ability to inhibit the growth of *S. thypi* and *S. aureus* bacteria.

Keyword: Black honey, lactic acid bacteria, antimicrobial activities, Secondary metabolites

PENDAHULUAN

Sumbawa merupakan salah satu daerah yang dikenal sebagai daerah penghasil madu di Indonesia. Salah satu jenis madu Sumbawa yaitu madu hitam. Madu hitam adalah jenis madu yang dihasilkan oleh lebah *Trigona spp* (Fitrianiingsih *et al.*, 2014) dan memiliki rasa yang masam. Madu yang dihasilkan oleh lebah *Trigona spp*. diketahui memiliki kandungan vitamin C yang tinggi dan berfungsi sebagai antibiotik, antioksidan, antitoksin, serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Putra *et al.*, 2014).

Manfaat yang diperoleh dari madu hitam sumbawa salah satunya disebabkan oleh adanya bakteri asam laktat pada madu tersebut. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu jenis mikroba yang mampu hidup dalam kondisi asam terutama pada bahan makanan. BAL merupakan kelompok bakteri gram positif yang tidak menghasilkan spora. BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai hasil fermentasi bahan makanan seperti gula dan karbohidrat (Pato, 2003). Secara umum bakteri asam laktat memiliki ciri yaitu bereaksi negatif terhadap uji katalase dan bereaksi positif terhadap pewarnaan gram (Romadon *et al.*, 2012). Beberapa marga dari bakteri asam laktat yang telah diketahui yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*. (Widyastuti, 1999).

Selain menghasilkan asam laktat, BAL juga diketahui mampu menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, dan asam organik (sitrat, laktat, dan lain-lain) (Desniar *et al.*, 2016). Bakteriosin adalah senyawa yang digunakan

sebagai pengawet, sedangkan asam asetat, asam laktat, dan asam propionat merupakan agen antimikroba yang banyak digunakan dalam industri pangan (Threon dan Lues, 2011). Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL seperti senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *L. plantarum* NS (9) dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan dari patogen makanan (Desniar *et al.*, 2013), juga dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, dan *S. thypimurium* (Desniar *et al.*, 2016).

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asam laktat dari madu hitam Sumbawa yang diharapkan mampu menghasilkan senyawa antimikroba yang bermanfaat.

METODE PENELITIAN

Isolasi Bakteri

Madu hitam diperoleh dari Desa Kelungkung, Kecamatan Batu Lanteh, Kabupaten Sumbawa. Madu hitam diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dalam 5 ml media MRSB. Sampel madu kemudian dinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sampel dengan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} disebar pada media MRSA, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Chotiah, 2013).

Uji Morfologi

Uji morfologi bakteri meliputi bentuk, warna, tepian, *elevation*, ukuran, *appearance* dan teksturnya.

Uji Pewarnaan Gram

Kaca preparat yang akan digunakan dibersihkan dengan alkohol kemudian dipanaskan di dekat nyala api. Isolat bakteri diteteskan pada kaca preparat menggunakan mikropipet,

kemudian dipanaskan di dekat api hingga isolat kering. Isolat bakteri ditetesi dengan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan aquades. Hasil pewarnaan kristal ungu ditetesi dengan lugol, didiamkan selama 2 menit dan kemudian dicuci dengan aquades. Hasil pewarnaan lugol ditetesi dengan etanol dan kemudian dicuci dengan aquades. Hasil pewarnaan dengan etanol ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci kembali dengan aquades dan hasil pewarnaan diamati (Hadioetomo,1993).

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% pada gelas obyek yang bersih. Isolat bakteri kemudian ditetaskan pada gelas obyek yang telah ditetesi hidrogen peroksida. Suspensi dihomogenkan secara perlahan dan hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo, 1993).

Uji Antimikroba

Uji antimikroba menggunakan metode difusi agar atau sumur. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. Antimikroba yang digunakan adalah metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dari madu hitam Sumbawa. Kontrol positif terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. thypi* menggunakan antibiotik *ampicillin*.

Sebanyak 3 ml (telah dilakukan pengenceran) bakteri uji ditambahkan dalam 20 media NA, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril, ditunggu hingga memadat. Setelah memadat dibuat sumur dengan ukuran diameter 6 mm. Metabolit sekunder dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 50 µl. kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Pengamatan zona bening dilakukan pada jam ke-2, ke-4 dan ke-6 (Purwijantiningsih, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Morfologi, Pewarnaan Gram dan Katalase

Hasil isolasi dari madu Hutan Sumbawa diperoleh 20 isolat bakteri. Pengamatan morfologi dari ke dua puluh isolat bakteri menunjukkan ciri koloni yang relatif seragam yakni berbentuk bulat, berwarna putih, tepian gelombang, ketinggian cembung, ukuran kecil, mengkilap dan teksturnya mukoid.

Kedua puluh isolat bakteri kemudian diuji untuk mengidentifikasi isolat yang merupakan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang bereaksi positif pada pewarnaan gram dan bereaksi negatif dengan uji katalase. Tabel 1 menunjukkan hasil uji pewarnaan gram dan uji katalase, dimana diperoleh 10 isolat bakteri asam laktat yaitu MD 1, MD2, MD 3, MD 5, MD 6, MD 14, MD 15, MD 17, MD 18 dan MD 20.

Tabel 1. Hasil uji pewarnaan gram dan uji katalase

Isolat Bakteri Asam Laktat	Uji Pewarnaan Gram	Uji Katalase
MD 1	+	-
MD 2	+	-
MD 3	+	-
MD 4	+	+
MD 5	+	-
MD 6	+	-
MD 7	+	+
MD 8	+	+
MD 9	+	+
MD 10	-	-
MD 11	-	-
MD 12	-	-

MD 13	-	-
MD 14	+	-
MD 15	+	-
MD 16	+	+
MD 17	+	-
MD 18	+	-
MD 19	+	+
MD 20	+	-

Keterangan: Pewarnaan gram: (+) bakteri gram positif, (-) bakteri gram negatif.

Uji Antimikroba

Isolat bakteri yang dinyatakan sebagai bakteri asam laktat berdasarkan pengujian pewarnaan gram dan uji katalase kemudian diuji untuk melihat aktivitas antimikrobanya. Dalam pengujian antimikroba ini digunakan dua bakteri patogen yaitu *S. aureus* dan *S. thypi* yang masing-masing mewakili kelompok bakteri gram positif dan negatif. Adanya aktivitas penghambatan ditandai dengan adanya zona bening di sekitar sumur. Zona

bening yang terbentuk terdiri dari beberapa variasi ukuran, dikarenakan isolat bakteri asam laktat tersebut memiliki kemampuan penghambatan yang berbeda-beda. Menurut Purwijantiningsih (2014), setiap strain mikroorganisme memiliki resistensi yang berbeda terhadap bakteri ujinya. Tabel 2 menunjukkan hasil uji antimikroba terhadap bakteri *S. thypi* dan Tabel 3 menunjukkan hasil uji antimikroba pada bakteri *S. aureus*.

Tabel 2. Hasil uji antimikroba terhadap bakteri *Salmonella thypi*

Sampel	Ukuran Zona Bening (mm)		
	Jam ke- 2	Jam ke- 4	Jam ke- 6
Kontrol -	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
MD 1	10 ± 0,816 ^d	8,7 ± 0,471 ^d	8,3 ± 0,471 ^d
MD 2	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
MD 3	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
MD 5	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
MD 6	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
MD 14	0 ± 0 ^a	2 ± 0 ^b	1 ± 0 ^b
MD 15	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
MD 17	0 ± 0 ^a	1,7 ± 0,942 ^b	1 ± 0 ^b
MD 18	1 ± 0 ^b	1,3 ± 0,471 ^b	1 ± 0 ^b
MD 20	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Kontrol +	4 ± 0 ^c	6 ± 0 ^c	4 ± 0 ^c

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji *one-way* ANOVA dengan *level of significant* 0,05.

Berdasarkan Tabel 2 hasil uji antimikroba pada bakteri *S. thypi* jam ke-2, isolat bakteri asam laktat MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu 10 ± 0,816 mm berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 4 mm, isolat BAL MD 18 memiliki diameter zona bening sebesar 1 mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD 5, MD

6, MD7, MD 14, MD 15, MD 17 dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Pengamatan jam ke-4, isolat BAL MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu 8.7 ± 0,471 mm berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 6 mm, isolat BAL MD 17 dan MD 18 memiliki diameter zona bening sebesar 1,7 ± 0,942 mm dan 1,3 ± 0,471

mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD 5, MD 6, MD7, MD 14, MD 15 dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Pengamatan jam ke-6, isolat BAL MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu $8.3 \pm 0,471$ mm berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 4 mm, isolat BAL MD 17 dan MD 18 memiliki diameter zona bening sebesar 1 mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD 5, MD 6, MD7, MD 14, MD 15 dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Hal ini menunjukkan bahwa dari 10 isolat bakteri asam laktat, isolat MD 1

merupakan bakteri asam laktat yang paling efektif sebagai antimikroba. Hal ini ditandai dengan luasnya zona bening yang terbentuk dibandingkan isolat lain dan kontrol positif, baik pada pengamatan jam ke-2, ke-4, maupun jam ke-6. Kemampuan penghambatan bakteri asam laktat dipengaruhi oleh produksi metabolit sekunder bakteri tersebut, diantaranya adalah hidrogen peroksida, karbondioksida dan senyawa peptida antimikroba yakni bakteriosin (Purwijantiningih, 2014).

Tabel 3. Hasil uji antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel	Aktivitas Antibakteri/Jam (mm)		
	Jam 2	Jam 4	Jam 6
Kontrol -	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 1	$5,7 \pm 2,357^b$	$7 \pm 2,16^b$	$8,7 \pm 2,357^b$
MD 2	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 3	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 5	0 ± 0^a	1 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 6	0 ± 0^a	1 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 14	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 15	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 17	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 18	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
MD 20	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
Kontrol +	9 ± 0^c	10 ± 0^c	8 ± 0^b

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji *one-way ANOVA* dengan *level of significant 0,05*.

Berdasarkan Tabel 3 hasil uji antimikroba pada bakteri *S. aureus* jam ke-2, isolat bakteri asam laktat MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu $5,7 \pm 2,357$ mm berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 9 mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD 5, MD 6, MD 7, MD 14, MD 15, MD 17, MD 18, dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Pengamatan jam ke-4, isolat BAL MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu $7 \pm 2,16$ mm berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 10 mm, isolat BAL MD 5 dan MD 6 memiliki diameter zona bening sebesar 1 mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD7, MD 14, MD 15, MD 17, MD 18 dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Pengamatan jam ke-6, isolat BAL MD 1 memiliki zona bening dengan diameter paling besar yaitu $8.7 \pm 2,357$ mm tidak berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu 8 mm, sedangkan isolat BAL MD 3, MD 5, MD 6, MD 7, MD 14, MD 15, MD 17, MD 18, dan MD 20 tidak memiliki zona bening.

Seperti halnya pengujian antimikroba dengan bakteri *S. thypi*, pengujian dengan bakteri *S. aureus* menunjukkan hasil yang sama, yakni isolat BAL MD 1 merupakan bakteri yang paling efektif sebagai antimikroba.

Bakteri asam laktat menghasilkan berbagai senyawa antimikroba seperti senyawa asam laktat, hidrogen peroksida (H_2O_2), karbon dioksida, diasetil, dan senyawa massa molekul

tinggi seperti bakteriosin (Mobolaji dan Wuraola, 2011). Senyawa asam laktat merupakan asam organik dari fermentasi BAL (Ammor *et al.*, 2006). Asam laktat memiliki kemampuan antimikroba karena mampu mengganggu kerja membran sel, menghambat transpor aktif, mengurangi pH intraseluler dan menghambat berbagai fungsi metabolisme (Rattanachanaikunsopon dan Phumkhachorn, 2010).

Bakteri asam laktat juga mampu menghasilkan senyawa hidrogen peroksida (H₂O₂) (Abbas *et al.*, 2010). Kemampuan antimikroba dari senyawa hidrogen peroksida dihasilkan dari oksidasi gugus sulfhidril yang menyebabkan denaturasi sejumlah enzim, dan dari peroksidasi membran lipid sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran dan sebagai prekursor untuk produksi radikal bebas bakterisida seperti superoksida dan hidoksil yang dapat merusak DNA (Ammor *et al.*, 2006).

Adanya perbedaan kemampuan masing-masing isolat bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *S. thypi* dapat disebabkan karena perbedaan jenis senyawa metabolit yang dihasilkan. Selain itu terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi besar kecilnya zona bening yang dihasilkan oleh metabolit sekunder bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen yaitu kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder, jumlah senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan, komposisi medium dan lama waktu inkubasi (Situmeang *et al.*, 2017).

SIMPULAN

Ditemukan 10 isolat bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari madu hitam Sumbawa. Dari kesepuluh isolat bakteri tersebut, bakteri asam laktat MD1 menghasilkan metabolit sekunder yang paling efektif sebagai antimikroba terhadap bakteri *S. thypi* dan *S. aureus* yang diamati pada jam ke-2, ke-4 dan ke-6.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, M.E., Luo, W., Zhu, L., Zou, J., dan Tang, H. 2010. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. *Food Chemistry*. 120: 327-331.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1— Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*. 17(6): 454-461.
- Chotiah, S. 2013. Penapisan Bakteri Asam Laktat Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan veteriner 2013.
- Desniar, Rusmana. I., Suwanto. A., Mubarik. N.R. 2013. Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated from An Indonesian Fermented Fish (Bekasam) And Their Antimicrobial Activity Against Pathogenic Bacteria. *Emir. J. Food Agric*. 25(6): 489-494.
- Desniar, I. Setyaningsih., Y. I. Purnama. 2016. Penapisan dan Produksi Antibakteri *Lactobacillus plantarum* NS(9) yang diisolasi dari Bekasam Ikan Nila Atin. *JPHPI*. 19(2).
- Fitrianingsih, S.R., Khairat, A., Choesrina, R. 2014. Aktivitas Antibakteri Madu Hitam Pahit dan Madu Hitam Manis Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Galenika*. 1(2): 32-37.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Mobolaji, OA & Wuraola, FO. 2011. Assesment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize products-ogi and kunni-zaki.

- Malaysian Journal of Microbiology*. 7 (3): 124-128.
- Pato, U. 2003. Potensi Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker. *Jurnal Natur Indonesia*. 5(2): 162-166.
- Purwijantiningsih, E. 2014. Viabilitas Bakteri Asam Laktat dan Aktivitas Antibakteri Produk Susu Fermentasi Komersial terhadap Beberapa Bakteri Patogen Enterik. *Biota*. 19(1): 15-21.
- Putra. P.A.H., N.L.Watniasih., N.M.Suartini. 2014. Struktur dan Produksi Lebah *Trigona* spp. pada Sarang Berbentuk Tabung dan Bola. *JURNAL BIOLOGI*. 18 (2) : 60-64.
- Rattanachaikunsopon, P., dan Phumkhachorn, P. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of biological research*. 1(4): 218-228.
- Romadon, Subagiyo, S. Margino. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin sebagai Agen Antibakteria pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan*. 8(1).
- Situmeang S.M.F, Musthari, Riadi S. 2017. Isolasi Dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (Bal) Dari Yoghurt Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Biosains*. 3(3): 144-152.
- Theron M.M., Lues J.F.R. 2011. *Organic Acids and Food Preservation. United States: CRC Press*. 273.
- Widyastuti. Y., dan Sofarianawati, E. 1999. Karakter Bakteri Asam Laktat *Enterococcus* sp. yang diisolasi dari Saluran Pencernaan Ternak. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 4 : 50-53.