

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI BAKTERI ASAM
LAKTAT PADA MINUMAN CLASSIC ENZYME BERBAGAI
MACAM BUAH TERHADAP PERTUMBUHAN
BAKTERI STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Siti Salimah Harahap^{1*}, Ridwanto², Anny Sartika Daulay³, Yayuk Putri Rahayu⁴
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan,
Indonesia^{1,2,3,4}

*Corresponding Author : harahapsalimah27@gmail.com

ABSTRAK

Classic Enzyme adalah cairan yang dihasilkan dari buah-buahan melalui proses fermentasi dengan waktu panen 1 tahun. Bakteri Asam Laktat dapat di isolasi dari minuman *Classic Enzyme*. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mendapatkan daya hambat antibakteri dari isolat BAL yang terdapat pada minuman *classic enzyme*. Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif dan kuantitatif dengan uji organoleptik, pengukuran pH dan % kadar asam laktat. Isolat yang telah diisolasi dikarakterisasi secara makroskopis (warna, bentuk, ukuran koloni) dan mikroskopis (pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora). Uji biokimia (uji katalase dan tipe fermentasi). Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dengan metode difusi cakram. Hasil Penelitian organoleptik *classic enzyme* memiliki aroma khas fermentasi, rasa asam, warna kuning muda keruh dan tekstur cair dengan pH 4,70 dan kadar asam laktat rata-rata 1,0717%. Dari isolasi 6 isolat yaitu BAL 1, BAL 2, BAL 3, BAL 4, BAL 5 dan BAL 6. Karakteristik makroskopis semua BAL berwarna putih susu, BAL 1, BAL 2, BAL 3 dan BAL 6 berbentuk batang sedangkan BAL 4 dan BAL 5 berbentuk bulat. Ukuran koloni berkisar 2,0-2,3 mm. pH sampel 4,70. Karakteristik mikroskopis semua isolat mempunyai pewarnaan gram positif dan endospora negatif. Karakteristik uji biokimia semua isolat katalase negatif dan tipe fermentasi homofermentatif. Semua isolat BAL dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat berkisar 8,8 mm hingga 10,6 mm. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa isolat yang diisolasi dari *Classic enzyme* adalah Bakteri Asam laktat yang memiliki aktivitas antibakteri yang berpotensi sebagai sumber probiotik.

Kata kunci : aktivitas antibakteri, bakteri asam laktat, *classic enzim, s.aureus*

ABSTRACT

Classic enzyme is a liquid produced from fruit through a fermentation process with a harvest time of one year. Lactic acid bacteria can be isolated from classic enzyme drinks. The aim of this research was to isolate and obtain the antibacterial inhibitory power of LAB isolates found in classic enzyme drinks. This research is a type of qualitative and quantitative descriptive research with organoleptic tests, measuring pH and % lactic acid levels. The isolated isolates were characterized macroscopically (Color, shape, colony size) and microscopically (Gram staining and endospore staining). Biochemical test (catalase test and fermentation type). Test antibacterial activity against pathogenic bacteria using the disc diffusion method. Organoleptic research results classic enzyme has a honey aroma, sour taste, cloudy light yellow color and liquid texture with a pH of 4.70 and an average lactic acid content of 1.0717%. From the isolation of 6 isolates namely BAL 1, BAL 2, BAL 3, BAL 4, BAL 5, and BAL 6. The macroscopic characteristics of all LAB are milky white in color, BAL 1, BAL 2, BAL 3 and BAL 6 are rod-shaped while BAL 4 and BAL 5 round shape. Colony size ranges from 2.0 to 2.3 mm. The pH of the sample is 4.70. The microscopic characteristics of all isolates had positive gram staining and negative endospores. The biochemical test characteristics of all catalase isolates were negative and the fermentation type was homofermentative. All LAB isolates could inhibit the growth of staphylococcus aureus bacteria with an inhibition zone diameter ranging from 8.8 to 10.6 mm. From these results it was concluded that the isolate isolated from classic enzyme was lactic acid bacteria which had antibacterial activity and the potential to be a source of probiotics.

Keywords : antibacterial activity, lactic acid bacteria, *classic enzyme, staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat adalah bakteri gram positif yang memiliki bentuk batang atau kokus, tidak membentuk spora, dan mampu menghasilkan asam laktat serta berbagai zat antimikroba seperti asam organik, bakteriosin, hidrogen peroksida, karbondioksida, dan alkohol. Bakteri ini sering digunakan dalam industri pangan, terutama dalam produk fermentasi sebagai pengganti pengawet kimia untuk memperpanjang masa simpan makanan. Selain itu, bakteri asam laktat juga dimanfaatkan di bidang kesehatan, misalnya dalam minuman probiotik. Sebagai contoh, *Lactobacillus casei* digunakan sebagai starter dalam pembuatan probiotik air kelapa muda, yang berfungsi menjaga kesehatan tubuh, merangsang respons kekebalan, dan mengurangi bakteri patogen (Rasyid, 2021).

Penelitian mengenai isolasi bakteri asam laktat telah dilakukan secara luas, menunjukkan bahwa buah-buahan dan sayuran seperti durian, nanas, sirsak, kakao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, dan kacang panjang berpotensi menjadi sumber bakteri asam laktat (BAL) (Suwarny, 2022). Classic Enzyme merupakan cairan yang dihasilkan dari fermentasi buah-buahan selama satu tahun, menggunakan madu murni dalam proses pembuatannya. Minuman ini kaya manfaat bagi kesehatan jika dikonsumsi sesuai dosis yang dianjurkan. Penelitian oleh Agustina M. Iskandar (2023) menunjukkan bahwa classic enzim belimbung wuluh memenuhi standar mutu untuk dikonsumsi dan efektif sebagai hand sanitizer karena zat asamnya dapat mengganggu metabolisme bakteri, sehingga banyak bakteri tidak dapat tumbuh dalam kondisi asam tersebut. Salah satu sumber potensial untuk mengisolasi bakteri asam laktat adalah fermentasi buah-buahan, atau classic enzyme, yang memiliki banyak manfaat kesehatan. Berdasarkan beberapa artikel, uji laboratorium mikrobiologi mengenai minuman fermentasi classic enzyme masih jarang ditemukan, sehingga penelitian ini penting untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat dalam classic enzyme serta aktivitas antibakterinya terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat dalam minuman classic enzyme. Selanjutnya, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dari isolat BAL yang diperoleh, khususnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*. Dengan demikian, penelitian ini tidak hanya berfokus pada pengenalan bakteri asam laktat dalam produk minuman tersebut, tetapi juga pada penilaian efektivitasnya dalam menekan aktivitas bakteri berbahaya.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Daerah Sumatera Utara, yang terletak di Jl. Williem Iskandar Pasar V Barat I No.4 Medan, pada periode Maret hingga Juni 2024. Dalam pelaksanaannya, digunakan berbagai alat seperti hot plate, autoklaf, timbangan analitik, mikropipet, mikroskop, lemari es, serta peralatan mikrobiologi seperti bunsen, beaker glass, dan lainnya. Bahan-bahan yang digunakan meliputi sampel minuman classic enzyme, isolat bakteri *Staphylococcus aureus*, serta berbagai media pertumbuhan seperti MRSA, MRSB, NA, dan MHA, bersama dengan aquades steril, alkohol, pewarnaan Gram dan endospora, serta bahan-bahan pendukung lainnya.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman classic enzyme yang merupakan hasil fermentasi alami dari 14 jenis buah-buahan yang diperoleh dari pedagang buah di sekitar Kecamatan Hamparan Perak. Pengukuran pH sampel dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dikalibrasi hingga pH 7, kemudian pH sampel diukur sampai pembacaan stabil. Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari classic enzyme dilakukan menggunakan media Man Rogosa Sharpe (MRS) broth dan agar, diikuti dengan proses

pengenceran bertingkat dan inkubasi. Dari isolasi ini, enam koloni BAL dipilih dan dikultur, kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis, termasuk pewarnaan Gram dan endospora, serta diuji biokimia melalui uji katalase dan tipe fermentasi. Selain itu, uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengkultur BAL dan bakteri patogen *S. aureus* pada media yang sesuai, diikuti dengan pengukuran zona hambat yang terbentuk setelah inkubasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat dalam classic enzyme serta mengevaluasi aktivitas antibakterinya terhadap pertumbuhan bakteri patogen.

HASIL

Pengukuran pH Sampel *Classic Enzyme*

Sampel *Classic Enzyme* merupakan cairan hasil dari fermentasi yang memiliki pH yang asam karena menghasilkan produk akhir berupa asam laktat. Gambar pengukuran pH sampel *Classic Enzyme* dapat dilihat berikut:



Gambar 1. Pengukuran pH *Classic Enzyme*

Dari pengukuran tersebut di peroleh nilai pH dari sampel classic enzim sebesar 4,70 dimana pH tersebut termasuk rentang pH yang asam.

Penetapan Kadar Asam Laktat pada Minuman *Classic Enzyme*

Kadar asam laktat pada sampel *classic enzyme* dihitung melalui metode titrasi dengan menggunakan pentiter NaOH 0,05 N dan indikator phenolphthalein (PP) 0,05 N hingga terjadi perubahan warna. Perubahan warna mengindikasikan telah tercapainya titik ekivalen dalam proses titrasi, yang artinya asam yang terbentuk selama proses fermentasi sudah dinetralkan oleh basa NaOH (Touret et al., 2018). Titrasi dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Adapun tabel hasil uji kadar asam laktat pada *classic enzyme* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. % Kadar Asam Laktat Pada Sampel Minuman *Classic Enzyme*

Uji Titrasi	Volume NaOH 0,05N	% Kadar Asam Laktat
Titrasi ke 1	22,8 ml	1,0670 %
Titrasi ke 2	23 ml	1,0764 %
Titrasi ke 3	22,9 ml	1,0717 %
Rata-rata	22,9 ml	1,0717 %

Pada perhitungan kadar asam laktat didapat rata-rata volume NaOH 0,05 N yang terpakai sebagai pentiter sebanyak 22,9 ml dengan rata-rata % Kadar asam laktat sebesar 1,0717%. Dimana kadar tersebut memenuhi standar SNI 01-2981-1992 yang menyatakan bahwa keasaman minuman probiotik 0,5-2,0 %. Nilai Total asam yang didapatkan diduga disebabkan pengaruh tingginya kadar laktosa pada *classic enzyme* yang disebabkan adanya proses fermentasi yang melibatkan BAL dengan laktosa. Asam laktat terbentuk karena adanya aktivitas BAL dalam memfermentasi laktosa dan gula menjadi asam laktat.

Isolasi BAL dari *Classic Enzyme*

Pada isolasi bakteri asam laktat di lakukan *enrichment* terlebih dahulu pada sampel agar bakteri dapat aktif kembali dengan nutrisi yang diperlukan nya yang terdapat pada media *MRS Broth* tersebut. Hasil *enrichment* dapat dilihat berikut:



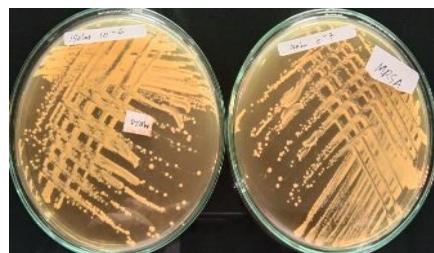
Gambar 2. Hasil *Enrichment Classic Enzyme*

Pada penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil *enrichment* bakteri asam laktat pada media *MRS Broth* yang semula berwarna orange tua yang bening berubah menjadi warna orange muda keruh dan terdapat endapan. Hal tersebut menandakan bahwa bakteri asam laktat telah tumbuh pada media *MRS Broth* dan dapat di lanjutkan untuk pengenceran bertingkat. Selanjutnya pada pengenceran bertingkat dilakukan dengan memipet 1 ml sampel Classic enzim hasil *enrichment* dimasukkan ke dalam 9 ml media *MRS Broth* didapat pengenceran 10^{-1} dan dilanjutkan sampai pengenceran 10^{-7} . Hasil pengenceran bertingkat kultur *Classic Enzyme* dapat dilihat berikut:



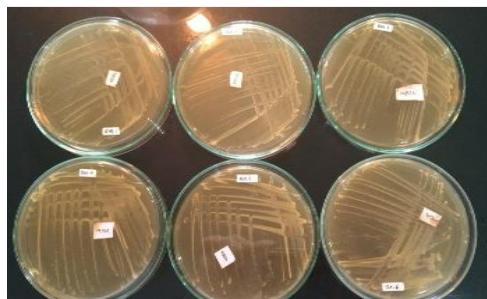
Gambar 3. Hasil Pengenceran 10^{-1} Samapi 10^{-7} Kultur *Classic Enzyme*

Pengenceran dilakukan agar didapatkan koloni bakteri asam laktat yang lebih spesifik dan murni atau koloni tunggal sehingga pada saat di goreskan pada media padat MRS Agar akan di dapat koloni tunggal yang tumbuh sehingga memudahkan kita untuk mengambil isolat tersebut dari beberapa koloni saja untuk penanaman isolat bakteri asam laktat selanjutnya yang akan diuji. Selanjutnya penanaman bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose kultur BAL pada pengenceran 10^{-7} digoreskan pada petri yang berisi 15 ml media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil isolat bakteri asam laktat dari *classic enzyme* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Isolat Bakteri Asam Laktat Dari *Classic Enzyme*

Setelah didapatkan isolat yang tumbuh dari pengenceran tersebut maka dilakukan isolasi kembali untuk mendapatkan isolat murni dengan memilih 6 koloni BAL lalu di strek pada 6 media MRS Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan diberi nama isolat BAL1, BAL 2, BAL 3, BAL 4, BAL 5 dan BAL 6. Dimana ke 6 isolat tersebut akan digunakan sebagai isolat uji selanjutnya. Hasil ke 6 isolat BAL dari classic enzim dapat dilihat pada gambar 5.

Gambar 5. Isolat Uji BAL Dari *Classic Enzyme*

Identifikasi Bakteri Asam Laktat Uji Makroskopis

Tabel 2. Karakterisasi Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat pada *Classic Enzyme*

No	Kode Isolat	Morfologi Koloni				
		Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna	Ukuran
1	BAL 1	Batang	Cembung	Licin	Putih Susu	2,2 mm
2	BAL 2	Batang	Cembung	Licin	Putih Susu	2,0 mm
3	BAL 3	Batang	Cembung	Licin	Putih Susu	2,2 mm
4	BAL 4	Bulat	Cembung	Licin	Putih Susu	2,2 mm
5	BAL 5	Bulat	Cembung	Licin	Putih Susu	2,3 mm
6	BAL 6	Batang	Cembung	Licin	Putih Susu	2,1 mm

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua isolat berwarna putih susu, tepian licin, elevasi cembung. 4 isolat berbentuk batang dan 2 isolat berbentuk bulat dengan ukuran 2,0 mm sampai 2,3 mm.

Uji Mikroskopis dan Uji Biokimia

Tabel 3. Hasil Pengamatan Karakterisasi Isolat BAL Dari *Classic Enzyme*

Isolat	Pengamatan				
	Pewarnaan Gram	Bentuk Sel	Endospora	Uji Katalase	Uji Tipe Fermentasi
BAL 1	+	Batang	-	-	Homofermentatif
BAL 2	+	Batang	-	-	Homofermentatif
BAL 3	+	Batang	-	-	Homofermentatif
BAL 4	+	Bulat	-	-	Homofermentatif
BAL 5	+	Bulat	-	-	Homofermentatif
BAL 6	+	Batang	-	-	Homofermentatif

Dari hasil pewarnaan gram didapat bahwa semua isolat BAL merupakan bakteri gram positif karena berwarna ungu. Berdasarkan perbedaan kandungan dan dinding sel, bakteri dapat digolongkan menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif dinding selnya tersusun atas PG (Peptidoglikan) terdapat senyawa yang disebut asam teikoat.

Dari hasil pewarnaan endospora menunjukkan bahwa tidak ditemukan endospora pada sel ke 6 isolat bakteri dari minuman *classic enzyme* yang terlihat dibawah mikroskop hanya sel vegetatif yang berwarna merah hal ini menandakan ciri bakteri asam laktat yang tidak memiliki spora. Bakteri asam laktat pada saat pewarnaan yang terlihat hanya sel vegetatif yang berwarna merah ketika diamati di bawah mikroskop. Bakteri yang tidak memiliki spora cenderung tidak tahan terhadap pewarnaan karena hanya memiliki sel vegetatif. Saat diwarnai dengan *malachite green*, sel vegetatif akan mampu berikatan dengan pewarna tersebut tetapi dapat dilunturkan setelah dilakukan pencucian karena tidak berikatan kuat dengan pewarna *malachite green*.

Uji Katalase dilakukan pada 6 isolat bakteri dari *classic enzyme* yang ditetesi dengan H₂O₂ 3% dan hasilnya semua isolat tidak membentuk gelembung gas yang menandakan bahwa ke 6 isolat tersebut adalah katalase negatif. Hasil dari uji katalase terhadap 6 isolat BAL menunjukkan bahwa 6 isolat BAL tersebut telah memenuhi ciri-ciri BAL yaitu katalase negatif karena tidak dapat menguraikan H₂O₂ sehingga tidak menghasilkan gelembung gas. Katalase dalam sel organisme berperan untuk mencegah akumulasi H₂O₂ sebagai produk dari proses metabolisme hingga ke tingkat toksik. H₂O₂ jika dapat diuraikan dengan enzim katalase maka akan menghasilkan oksigen yang bersifat toksik. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang negatif menghasilkan enzim katalase.

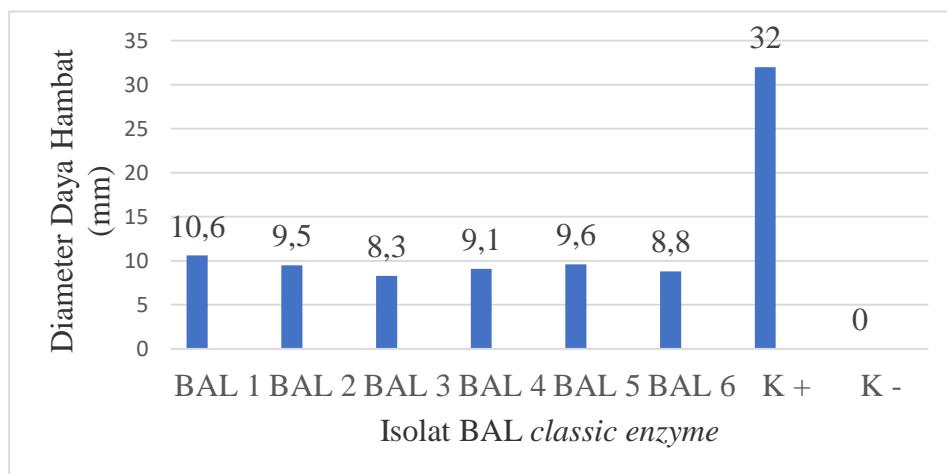
Pada uji tipe fermentasi terhadap ke 6 isolat BAL dilakukan dengan memasukkan 1ml isolat BAL ke dalam tabung yang berisi 9 ml media MRS Broth yang telah di isi dengan tabung durham dengan keadaan terbalik dan diinkubasi selama 24 jam nantinya akan dilihat ada tidak nya gelembung gas yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Dari hasil pengujian semua isolat uji tidak ada yang menghasilkan gelembung gas pada tabung durham, hal ini menandakan ciri dari bakteri asam laktat yang memiliki tipe fermentasi homofermentatif. Hasil uji produksi gas menunjukkan bahwa 6 isolat BAL tidak menghasilkan gas atau bersifat tipe fermentasi homofermentatif. BAL yang bersifat homofermentatif adalah BAL yang hanya menghasilkan asam laktat dari metabolismenya, sedangkan BAL heterofermentatif adalah BAL yang dapat menghasilkan senyawa lain selain dari asam laktat.

Uji Aktivitas Antibakteri BAL Dari Isolat *Classic Enzyme* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Aktivitas antimikroba yang utama dari BAL disebabkan oleh produksi asam laktat. Asam laktat adalah asam organik utama fermentasi BAL terjadi kesetimbangan antara bentuk terdisosiasi dengan tidak terdisosiasi. Asam laktat mengganggu potensial membran sel, menghambat transport aktif dan menurunkan pH intrasel serta menghambat beberapa fungsi metabolismik. Aktivitas antimikroba BAL dilakukan dengan metode difusi cakram. Diameter cakram yang digunakan adalah 5 mm. pengujian aktivitas antimikroba dilakukan sebanyak dua kali. Rata-rata diameter zona hambat BAL terhadap bakteri patogen ditampilkan pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Zona Hambat Isolat BAL Dari *Classic Enzyme* pada Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Isolat	Rata-rata Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
BAL 1	10,6	Kuat
BAL 2	9,5	Sedang
BAL 3	8,3	Sedang
BAL 4	9,1	Sedang
BAL 5	9,6	Sedang
BAL 6	8,8	Sedang
Kontrol Positif	32	Sangat Kuat
Kontrol Negatif	0	Tidak Ada

Gambar 6. Grafik Diameter Daya Hambat BAL pada Isolat *Classic Enzyme*

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat BAL dari *classic enzyme* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah disajikan pada tabel 3 dan grafik dapat dilihat hasil zona hambat yang diuji pada 6 isolat BAL Dimana zona hambat yang tertinggi terdapat pada isolat BAL 1 sebesar 10,6 mm dengan kategori zona hambat sangat kuat karena diatas 10 mm, sementara itu zona hambat terendah terdapat pada isolat BAL 3 sebesar 8,8 mm dengan kategori zona hambat sedang, begitu pula dengan isolat BAL 2, BAL 4, BAL 5 dan BAL 6 zona hambat berturut-turut sebesar 9,5 mm, 9,1 mm, 9,6 mm dan 8,8 mm dengan kategori zona hambat sedang. Berdasarkan hasil zona hambat tersebut terlihat pada grafik bahwa zona hambat yang dihasilkan BAL 1 sampai dengan BAL 6 tidak memiliki rentang yang jauh hanya berbeda sedikit saja dimana BAL 1 memiliki zona hambat yang tertinggi 10,6 mm dan BAL 3 memiliki zona hambat terendah 8,3 mm dapat dikatakan bahwa dari 6 isolat BAL classic enzim dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang terlihat dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram yang dihasilkan dari isolat BAL yang diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Hasil zona hambat BAL 1 sampai BAL 6 memiliki rentang yang sangat jauh pada kontrol positif dengan menggunakan amoxicillin zona hambat sebesar 32 mm (sangat kuat) sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dikarenakan amoxicillin merupakan obat sintesis yang secara luas dapat menginfeksi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Adapun tabel kategori zona hambat bakteri terdapat pada tabel 5.

Tabel 5. Kategori Rerata Diameter Panghambatan Zat Antibakteri

Zona hambat	Kategori
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-19 mm	Kuat
20 mm	Sangat kuat

Dari data mengkategorikan rerata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh zat antibakteri berdasarkan tingkat efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Kategori ini terbagi menjadi empat tingkat. Zona hambat dengan diameter kurang dari 5 mm dikategorikan sebagai lemah, menunjukkan bahwa zat antibakteri tersebut hampir tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang berukuran antara 5 hingga 10 mm dianggap sedang, menandakan efek antibakteri yang moderat. Zat antibakteri dalam kategori ini memiliki kemampuan yang cukup baik namun belum optimal. Zona hambat dengan diameter antara 10 hingga 19 mm termasuk dalam kategori kuat, menunjukkan bahwa zat

antibakteri tersebut memiliki potensi yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Terakhir, zona hambat dengan diameter 20 mm atau lebih dikategorikan sebagai sangat kuat, yang menunjukkan bahwa zat antibakteri tersebut sangat efektif dan memiliki kemampuan yang sangat tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

PEMBAHASAN

Dari hasil pengukuran, nilai pH sampel classic enzim ditemukan sebesar 4,70, yang menunjukkan pH asam. Penelitian sebelumnya oleh Agustina (2023) menunjukkan pH rata-rata 1,96 pada fermentasi classic enzim dari belimbing wuluh. Penurunan pH ini disebabkan oleh akumulasi asam laktat yang dihasilkan selama proses fermentasi oleh bakteri homofermentatif (Fanworth, 2005). Peningkatan konsentrasi asam organik seiring berjalannya waktu fermentasi berkontribusi pada penurunan pH, yang dapat menghambat mikroba pembusuk dan membunuh mikroba patogen.

Pada perhitungan kadar asam laktat, diperoleh rata-rata volume NaOH 0,05 N yang digunakan sebagai pentiter sebanyak 22,9 ml, dengan rata-rata kadar asam laktat sebesar 1,0717%. Kadar ini sesuai dengan standar SNI 01-2981-1992, yang menetapkan bahwa keasaman minuman probiotik harus berada dalam rentang 0,5-2,0%. Total asam yang terdeteksi kemungkinan dipengaruhi oleh tingginya kadar laktosa pada classic enzyme, yang dihasilkan melalui proses fermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL). Asam laktat terbentuk sebagai hasil dari aktivitas BAL dalam memfermentasi laktosa dan gula menjadi asam laktat. Penelitian oleh Nugroho dan rekan-rekannya (2023) mengungkapkan bahwa peningkatan total asam terjadi karena aktivitas bakteri yang mengubah laktosa dalam susu menjadi asam-asam organik, terutama asam laktat. Bakteri asam laktat, khususnya yang bersifat homofermentatif, dapat mengubah lebih dari 85% glukosa atau heksosa lainnya menjadi asam laktat.

Selanjutnya, proses enrichment bakteri asam laktat pada media MRS Broth ditandai dengan perubahan warna dari orange tua menjadi orange muda keruh dengan endapan, menunjukkan pertumbuhan bakteri asam laktat. Proses ini sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Aloysius (2019), di mana larutan menjadi keruh setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, menandakan pertumbuhan bakteri asam laktat. Pengenceran bertingkat dilakukan untuk memperoleh koloni bakteri yang lebih spesifik, dan pengamatan morfologi dari enam isolat BAL menunjukkan bahwa semua isolat berwarna putih susu dengan tepian licin dan elevasi cembung. Empat isolat berbentuk batang, dan dua berbentuk bulat, sesuai dengan deskripsi Hartini (2019) tentang bakteri asam laktat.

Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa semua isolat adalah bakteri gram positif karena warnanya ungu. Perbedaan ini dikarenakan struktur dinding sel bakteri, di mana bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan tebal yang lebih rentan terhadap antibiotik penisilin. Pewarnaan endospora mengungkapkan bahwa tidak ada endospora pada isolat yang hanya menunjukkan sel vegetatif berwarna merah, mengindikasikan bakteri asam laktat yang tidak memiliki spora. Uji katalase menunjukkan semua isolat sebagai katalase negatif, karena tidak menghasilkan gelembung gas saat ditetesi H₂O₂ 3%. Ini sesuai dengan sifat bakteri asam laktat yang tidak memproduksi enzim katalase, seperti dijelaskan oleh Hamidah dkk. (2019). Uji tipe fermentasi pada isolat BAL menunjukkan bahwa tidak ada gas yang dihasilkan, menandakan bahwa semua isolat adalah tipe fermentasi homofermentatif, yang hanya menghasilkan asam laktat dari metabolisme mereka.

Aktivitas antibakteri dari isolat BAL diuji menggunakan metode difusi cakram. Hasil menunjukkan zona hambat tertinggi pada isolat BAL 1 dengan diameter 10,6 mm, termasuk dalam kategori sangat kuat, sedangkan isolat BAL 3 memiliki zona hambat terendah 8,8 mm, tergolong sedang. Zona hambat pada isolat lainnya juga berada dalam kategori sedang. Perbandingan dengan kontrol positif amoxicillin yang menghasilkan zona hambat 32 mm

menunjukkan bahwa meskipun isolat BAL memiliki aktivitas antibakteri, kemampuannya masih di bawah antibiotik sintetis tersebut. Aktivitas antimikroba dari bakteri asam laktat dipengaruhi oleh komponen seperti asam laktat, bakteriosin, dan hidrogen peroksida, yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan mengontrol mikroorganisme lainnya. Secara keseluruhan, isolat BAL dari classic enzim menunjukkan potensi sebagai agen antimikroba dengan kategori zona hambat sedang, menjadikannya kandidat yang baik untuk aplikasi dalam minuman probiotik. Penelitian ini sejalan dengan temuan bahwa bakteri asam laktat memiliki aktivitas antimikroba yang signifikan dan dapat bermanfaat untuk kesehatan tubuh, seperti yang diungkapkan oleh studi-studi sebelumnya (Riadi dkk., 2017; Kiti dkk., 2019; Jandaik et al., 2013).

KESIMPULAN

Bakteri asam laktat ditemukan dalam minuman classic enzyme yang memiliki aroma khas madu, rasa asam, warna kuning muda keruh, dan tekstur cair dengan pH 4,7 serta kadar asam laktat rata-rata 1,0717%. Secara makroskopis, isolat bakteri asam laktat berbentuk bulat, berwarna putih susu, dengan elevasi cembung, tepian licin, dan ukuran berkisar antara 2,0 hingga 2,3 mm. Dalam uji mikroskopis, semua isolat menunjukkan gram positif, dengan isolat BAL 1, BAL 2, BAL 3, dan BAL 6 berbentuk batang, sementara isolat BAL 4 dan BAL 5 berbentuk bulat. Uji endospora menunjukkan hasil negatif untuk semua isolat. Dalam uji biokimia, semua isolat BAL menunjukkan hasil katalase negatif, dan uji fermentasi mengidentifikasi mereka sebagai bakteri homofermentatif. Aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat dalam minuman classic enzyme diuji terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*. Hasilnya menunjukkan bahwa diameter zona hambat untuk enam isolat BAL berkisar antara 8,3 hingga 10,6 mm, yang tergolong dalam kategori sedang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada pihak Laboratorium Kesehatan Daerah Sumatera Utara atas izin, dukungan, dan fasilitas yang telah diberikan, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Semoga kerja sama ini dapat terus terjalin untuk kemajuan ilmu pengetahuan di masa yang akan datang

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Utari dan Muhammad,I.H. (2023). Uji Organoleptik Dan Mikrobiologi Classic Enzim Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*). *Jurnal Indobiosains*. Vol 5 (2).
- Aloysius, A., Ulfa, A., Situmorang, A. K. F., Harmilena, H., & Fachrial, E. (2019). Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi Dari Makanan Tradisional Fermentasi Khas Batak “Naniura”. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*. Vol 6 (1). Hal 8-14.
- Antara, N.S., Ida, B.W.G., Pande, K.D.K., I Made, S.U. (2019). The Role of Lactic Acid Bacteria on Safety and Quality of Fermented Foods. *AIP Conference Proceedings*.
- AOAC. 1984. Official Methodes of Analysis of the Association of Analytical Chemist. 14th ed. AOAC Inc.Arington. Virginia.
- Arsy, D. A. F. (2022). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Nanas (*Ananas Comosus (L) Merr.*) Terhadap *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus Aureus*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Azhara, Izmi., M.Rais., Andi,S.,Reski.P.P. (2022). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta Asal Bantaeng. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol.23 (1).
- Brooks, Geo F.,Butel, Janet S.,Morse,Stephen A. (2010). *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Pertama. Jakarta : Salemba Medika.Hal:217-223
- Buckel, K. A. 2009. Ilmu Pangan. Jakarta: UI-Press.
- Dwijastuti, N. M. S., Sujaya, I. N., & Fatmawati, N. N. D. (2021). Isolation and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Urutan, Balinese Traditional Fermented sausage. *Metamorfosa : Journal of Biological Sciences*. Vol 8(1). Hal 81.
- Farnworth, E.D.R. (2005). Handbook of Fermented Functional Foods. CRC Press LLC. Florida.
- Finanda, Aprilia.,Mukrlina.,Rahmawati. (2021). Isolasi dan Karakterisasi Genus Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Daging Buah Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca L*). *Jurnal Protobion*.Vol.10 (2).
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon, R. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* Dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11-21.
- Hartini P, Purwanto H, Juliyarsi IY, Purwati E. 2019. Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* Fermentum Isolation From Tempoyak In Padang Pariaman District, West Sumatera Indonesia To Acid Condition, Bile Salt And Antimicrobial Activity. *Int Res J Pharm* 10: 70 73
- Hendarto, D. R., Arita, P. H., Elisa, E., Yoga, A. H. (2019). Mekanisme Biokimiawi Dan Optimalisasi *Lactobacillus bulgaricus* Dan *Streptococcus thermophilus* Dalam Pengolahan Yoghurt Yang Berkualitas. *Jurnal Sains Dasar*, 8 (1), 13-19.
- Jandaik, S. Sharma, M, Kumar, J. Singh, R. (2013). Antimicrobial Activity of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Milk Poducts. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 7(1) : 603-608.
- Kiti, A. A., Jamilah, I., & Rusmarilin, H. 2019. Aktivitas Antimikroba Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Pangan Plik U terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Khamir Candida albicans* secara in Vitro. *Journal of Healthcare Technology and Medicine*, 4(1), 118-126.
- Kurnia, M., Amir, H., & Handayani, D. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Makanan Tradisional Suku Rejang Di Provinsi Bengkulu: "Lemea". *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*. Vol 4 (1). Hal 25–32.
- Lestari, P. & Hartati, T.,(2017). Mikrobiologi Berbasis Inkuiry. Malang: Gunung Samudra.
- Manguntungi, B., Sari, A. P., Chaidir, R. R. A., Islam, I., Vanggy, L. R., Sufiyanti, N., ... & Kusuma, W. D. 2020. Isolasi, Karakterisasi, dan Aktivitas Antibakteri BAL Indigenous dari Sarang Lebah *Trigona* spp. Asal Kabupaten Sumbawa. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 8(1), 13-18.
- Manik M, Kaban J, Silalahi J, Ginting M. (2021). Lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential from Dengke Naniura. *Baghdad Sci J* 18 (1): 35-40. DOI: 10.21123/bsj.2021.18.1.0035.
- Nasri, N., Harahap, U., Silalahi, J., & Satria, D. (2021). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Dengke Naniura of Carp (*Cyprinus carpio*) against diarrhea-causing pathogenic bacteria. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. Vol 22 (8).
- NauE, D. B., Karneli, Syailendra, A., Syafitri, I., Wulandari, S., & Julianiti, W. (2022). Buah BIT (*Beta vulgaris L*) Sebagai Alternatif Safranin Pada Pewarnaan Gram. Husada Mahakam: *Jurnal Kesehatan*, Vol 24(12), 19-24.

- Nurhikmayani, R., Budi, S.D., Endah, R. (2019). Isolation and molecular identification of antimicrobial-producing Lactic Acid Bacteria from chao, South Sulawesi (Indonesia) fermented fish product. *BIODIVERSITAS*. Vol 20 (4).
- Ramadhanti, N., Melia, S., Hellyward, J., & Purwati, E. (2021). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from palm sugar from West Sumatra, Indonesia and their potential as a probiotic. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. Vol 22 (5).
- Rasyid, B., Sandi, K. M., Sudarmanto, I. G., & Karta, I. W. (2021). Isolasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari blondo virgin coconut oil terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedika*. Vol 13 (1). Hal 56-67.
- Rimadhini, F. N., Sumardianto, S., & Romadhon, R. (2020). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Rusip Ikan Teri (*Stolephorus* sp) Dengan Konsentrasi Gula Aren Cair Yang Berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*. Vol 2 (1). 54-63.
- Rizal, S., Udayana, S., & Suharyono, S. (2020). Kajian Potensi Sari Kulit Buah Nanas Yang Difermentasi Dengan *Lactobacillus Casei* Sebagai Minuman Probiotik Secara In Vivo. *Jurnal Agroindustri*. Vol 10 (1). Hal 12-20.
- Romadhon, Subagiyo, Sebastian M. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan* Vol. 8. No. 1.
- Sasmita, Aliansyah, H., Aisyah, N.S., Sukriani K. (2018). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Liur Basa (Limbah Sayur Bayam Dan Sawi). *As-Syifaa*. Vol 10 (2) : Hal. 141-151.
- Suwarny., Nur,Ismah.N. (2022). Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Enzim Protease Pada Sampel Beras Wakawondu Yang Berasal Dari Ereke (Buton Utara). *Jurnal MediLab Mandala Waluya*. Vol 6 (2).
- Widianingsih, M., & Setyorini, D. C. (2019). Identifikasi *Staphylococcus aureus* Pada Abon Sapi Di Pasar Pahing Kota Kediri. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. Vol 5 (2). Hal 99-105.