

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK SELAMA FERMENTASI GROWOL, MAKANAN TRADISIONAL INDONESIA

### *Isolation and Characterization of Amylolytic Lactic Acid Bacteria during Growol Fermentation, an Indonesian Traditional Food*

Widya Dwi Rukmi Putri<sup>1\*</sup>, Haryadi<sup>2</sup>, Djagal Wisesa Marseno<sup>2</sup>, M. Nur Cahyanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya  
Jalan Veteran, Malang, 65145

<sup>2</sup>Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Gadjah Mada  
Jalan Sosio Yustisio, Yogyakarta, 55281

\*Penulis Korespondensi: email wid2putri@yahoo.com

#### ABSTRAK

Bakteri asam laktat yang tumbuh selama fermentasi growol (makanan tradisional berbasis kasava) merupakan bakteri yang indigenus tumbuh pada media berbasis kasava. Isolat yang mampu tumbuh pada media tinggi pati memiliki kemampuan amilolitik dan berpotensi dimanfaatkan untuk produksi asam laktat dari pati mentah. Tujuan penelitian ini adalah isolasi bakteri asam laktat amilolitik dari fermentasi kasava pada pembuatan growol dan karakterisasi kemampuan isolat dalam produksi asam laktat dari pati mentah. Dua ratus tiga puluh satu isolat telah diisolasi dari fermentasi kasava selama 0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sejumlah 63 isolat adalah bakteri asam laktat dengan karakteristik gram positif, katalase negatif, tidak menghasilkan gas selama fermentasi gula. Tiga belas isolat diantaranya adalah bakteri asam laktat dengan kemampuan tumbuh pada media dengan pati sebagai satu-satunya sumber karbon. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa semua isolat tergolong dalam genus *Lactobacillus* dengan spesies *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus rhamnosus*.

Kata kunci: growol, pati kasava asam, bakteri asam laktat, kemampuan amilolitik, *Lactobacillus*

#### ABSTRACT

*Amylolytic lactic acid bacteria are a group of bacteria that capable to use starch as the only carbon source. Lactic acid bacteria naturally present in growol (a traditional food from fermented cassava) is an indigeneous bacteria that groww in cassava based media. The aims of this research were to isolate, characterize, and identify lactic acid bacteria during growol fermentation. Two hundred and thirty one colonies of lactic acid bacteria were isolated during 0, 24, 48, 72, 96, and 120 hours cassava fermentation. Sixty three isolates were characterized as gram positive, catalase negative, and non producing gas from glucose, but only thirteen isolates had amylolytic characteristics. Identification showed that all isolates were *Lactobacillus* genera specifically *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*.*

Keywords: growol, sour cassava starch, lactic acid bacteria, amylolytic ability, *Lactobacillus*

#### PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan memanfaatkan pati sebagai substratnya dikenal sebagai bakteri asam laktat amilolitik. Aktivitas bakteri asam laktat pada fermentasi bahan berpati berperan terhadap perubahan karakteristik produk untuk memproduksi

asam laktat, enzim spesifik, dan senyawa aromatik (Camargo *et al.*, 1988; Demiate *et al.*, 1999; Marcon *et al.*, 2006). Bakteri asam laktat dapat menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat

karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat (Reddy *et al.*, 2008; Petrov *et al.*, 2008).

BAL amilolitik telah diisolasi dari makanan tradisional berbasis sereal dan kasava terfermentasi (Nwankwo *et al.*, 1989; Olympia *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1995; Morlon-Guyot *et al.*, 1998; Sanni *et al.*, 2002). Kajian mikrobiologis pada fermentasi alami pati kasava asam di Columbia mengarah pada isolasi bakteri asam laktat amilolitik, *Lactobacillus (L) manihotivorans*, yang bersifat homolaktik dan menghasilkan lebih dari 98% L(+)-asam laktat (Morlon-Guyot *et al.*, 1998). Penelitian selanjutnya berhasil menemukan tujuh isolat *L. manihotivorans* pada proses produksi pati kasava asam yang enam di antaranya bersifat amilolitik dan dua diantaranya dapat memfermentasi beragam karbohidrat (Guyot *et al.*, 2003). Lacerda *et al.* (2005) menemukan *L. plantarum* dan *L. fermentum* yang dominan pada fermentasi alami kasava di Brazil, selain juga menemukan *L. perolans* dan *L. brevis*.

Salah satu makanan khas Indonesia berbasis kasava terfermentasi adalah growol. Uji mikrobiologis yang pernah dilakukan pada growol menunjukkan bahwa BAL yang tumbuh adalah jenis *Lactobacillus* yang bersifat homofermentatif (Muttarokah, 1998; Ngatirah, 2000), akan tetapi kemampuan amilolitik BAL tersebut belum diuji. Ngatirah (2000) mengidentifikasi satu isolat dari growol sebagai *Lactobacillus sake*/Mut 5.

Berbagai bentuk pengolahan bahan baku akan menentukan komposisi mikrobiota, termasuk keberadaan BAL amilolitik (Guyot *et al.*, 2000). Berdasarkan kemampuan enzim amilase yang dimiliki untuk menghidrolisis pati secara parsial, BAL amilolitik dapat memfermentasi berbagai macam bahan berpati. Pengembangan penelitian untuk mendapatkan strain dengan kemampuan memfermentasi pati menjadi asam laktat secara langsung (dengan satu tahapan) sangat penting untuk membuat proses menjadi lebih ekonomis. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat BAL indigenus dari fermentasi growol yang memiliki kemampuan amilolitik, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai inokulum untuk produksi asam laktat dari pati.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan baku untuk isolasi bakteri asam laktat pada penelitian ini adalah rendaman kasava varietas lokal dengan bentuk umbi pendek dan berwarna putih. Air perendam adalah air yang bersumber dari pegunungan daerah Kulonprogo, Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan adalah media pertumbuhan mikrobia MRS Broth (Oxoid Ltd.), ekstrak yeast (Oxoid Ltd.), pati larut (Difco), agar, peptone (Difco), glukosa, akuades,  $\text{CaCO}_3$ , natrium azida, alkohol, NaOH, safranin,  $\text{I}_2$ , KI, kristal violet, amonium oksalat, indikator pp, kapas dan kertas pembungkus. Bahan untuk identifikasi yaitu kit API 50 CHL (API system, Bio-merieux, Japan). Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *laminar air flow*, *vortex-mixer* model VM-2000, inkubator, autoklaf, spektrofotometer (UNICO UV-2100), timbangan digital (Denver Instrumen M-310), mikropipet (Soccorex), pH meter, dan sentrifusa.

### Persiapan Sampel

Dua sampel kasava yang terendam air dari tahap fermentasi pada pembuatan growol diambil dari produsen penghasil growol di Desa Sangon, Kulonprogo, Yogyakarta. Sampel secara aseptis dikemas dalam dua ember (wadah yang selalu digunakan untuk fermentasi) dan dibawa ke laboratorium. Sampel disimpan untuk dilanjutkan tahap fermentasinya pada suhu  $29 \pm 2$  °C selama lima hari (120 jam). Selama fermentasi sampel diambil secara aseptis setiap 12 jam untuk pengukuran pH serta setiap 24 jam untuk analisis mikrobiologis. Sampel untuk uji mikrobiologis diambil dari air rendaman dan umbi kasava yang direndam.

### Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Dua puluh lima gram sampel, masing-masing dari air rendaman dan umbi kasava yang direndam, ditimbang dalam Erlenmeyer steril dan dilarutkan dalam 225 mL larutan pepton 0.1% b/v. Sampel dihomogenasi menggunakan Stomacher 400 Lab Blender selama 1 menit dan selanjutnya dibuat seri pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ . Tiga seri pengenceran yang sesuai untuk setiap 24 jam fermentasi, dituangkan sebanyak 1 mL (dilakukan duplo) pada

medium *de Man Rogosa Sharp Agar* (de Man (1960)) yang disuplementasi dengan 1.5%  $\text{CaCO}_3$ . Petridis diletakkan dalam kantong plastic kedap udara dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Selanjutnya, koloni bakteri yang menghasilkan zona bening dengan karakter yang berbeda dihitung untuk enumerasi total bakteri penghasil asam. Isolat dengan zona bening dimurnikan dengan metode *streak plate*, kemudian ditumbuhkan dalam media agar tegak untuk analisis selanjutnya dan disimpan pada suhu -40 °C dalam tabung mikro dengan medium MRS-gliseryl 15% untuk penyimpanan dan pengawetan isolat. Untuk setiap uji karakterisasi isolat dari media agar tegak diremajakan dalam 1.5 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam. Karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) meliputi morfologi sel, pewarnaan gram, uji katalase, dan produksi gas dari glukosa. Selanjutnya isolat yang dikarakterisasi sebagai BAL diuji lebih lanjut kemampuan amilolitiknya pada media dengan pati sebagai satu-satunya sumber karbon.

#### **Karakterisasi Kemampuan Amilolitik Bakteri Asam Laktat**

##### **Analisis hidrolisis pati secara kualitatif**

Isolat bakteri asam laktat digoreskan pada MRS agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya masing-masing koloni dari isolat diambil dan digoreskan dalam bentuk garis lurus pada media pati agar dengan pati merupakan satu-satunya sumber karbon. Komposisi medium pati agar meliputi 10 g pati larut, 10 g pepton, 5 g ekstrak khamir, dan 15 g agar per liter. Setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam, masing-masing petri yang berisi isolat dituangi dengan larutan gram-iodin (0.5% kristal iodin ditambahkan pada larutan 1.5% larutan kalium iodida) untuk membentuk warna biru gelap karena terjadinya kompleks pati-iodin. *Strain* dengan kemampuan amilolitik akan menghidrolisis pati pada media di sekeliling tempat tumbuhnya dan dalam zona degradasi tidak terbentuk warna biru, yang merupakan dasar deteksi dan seleksi *strain* amilolitik. Zona bening akan tampak setelah beberapa saat ditambahkan larutan iodin dan kelebihan larutan iodine dibuang.

##### **Analisis Hidrolisis Pati secara Kuantitatif**

Isolat yang analisis kualitatif amilolitiknya menunjukkan hasil positif diuji lebih lanjut dengan analisis amilolitik

kuantitatif. Masing-masing isolat berumur 24 jam diambil sebanyak 25  $\mu\text{L}$  dan ditumbuhkan pada media pati terlarut cair dengan komposisi 5 g pati terlarut, 5 g pepton, 5 g ekstrak khamir, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0.01 g NaCl yang dilarutkan dalam 1 liter akuades. Selama 0, 24, dan 48 jam inkubasi, media cair diambil sebanyak 2 mL untuk diketahui profil degradasi patinya. Untuk uji degradasi pati 1 mL *broth* disentrifugasi untuk mengendapkan sel bakterinya, kemudian supernatant diencerkan 100 kali dengan akuades. Sebanyak 10 mL supernatan hasil pengenceran dimasukkan tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan gram iodin. Campuran dihomogenisasi dan absorbansi larutan yang membentuk senyawa kompleks berwarna biru diukur dengan spektrometer pada panjang gelombang 585 nm. Konsentrasi pati sisa dari masing-masing supernatan dihitung berdasarkan kurva standar.

#### **Identifikasi Bakteri Asam Laktat**

Isolat dengan karakter gram positif, katalase negatif, tidak memproduksi gas selama fermentasi, dan bersifat amilolitik, dikarakterisasi lebih lanjut kemampuannya dalam memfermentasi 49 jenis karbohidrat untuk diidentifikasi jenisnya menggunakan kit API 50 CHL (Biomerieux, Perancis). Isolat umur 24 jam digoreskan pada media MRS agar sehingga didapatkan koloni murni dalam jumlah banyak, selanjutnya disuspensikan pada medium API CHL dan dihomogenisasi. Suspensi isolat pada medium API CHL diteteskan pada API CHL strips yang berisi substrat 49 macam karbohidrat kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Kemampuan isolat dalam memfermentasi substrat diamati pada 24 dan 48 jam inkubasi. Perubahan warna dari biru gelap menjadi kuning dinyatakan sebagai perubahan yang positif. Hasil yang diperoleh diolah dengan menggunakan *software* API 50 CHL sehingga didapatkan data jenis bakteri untuk masing-masing isolat.

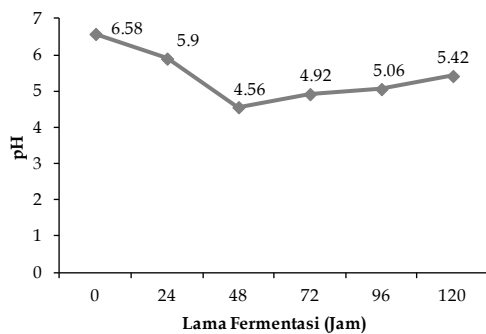
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Perubahan pH dan Jumlah Bakteri Asam Laktat selama Fermentasi Kasava pada Pembuatan Growol**

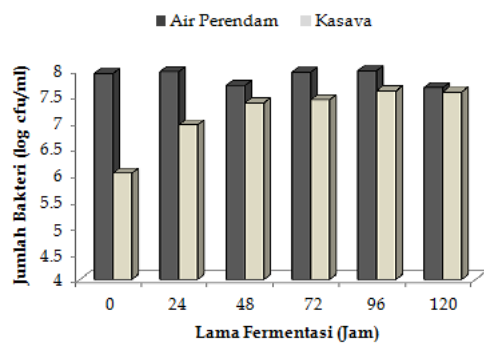
Hasil penelitian menunjukkan terjadinya perubahan pH selama lima hari fermentasi kasava. Di awal hingga tiga hari

fermentasi, terjadi penurunan pH yang cukup tajam yaitu dari 6.57 menjadi 4.66, yang kemudian meningkat kembali pada hari kelima fermentasi (Gambar 1). Kondisi ini paralel dengan perubahan jumlah isolat BAL yang diambil dari media fermentasi pada waktu yang sama (Gambar 2).

Bakteri penghasil asam terutama bakteri asam laktat merupakan jenis bakteri yang dominan selama fermentasi kasava pada pembuatan growol ini, sehingga produk metabolisemenya sangat mempengaruhi perubahan kondisi media. Peningkatan jumlah mikroba penghasil asam menyebabkan terjadinya penurunan pH selama fermentasi. Peningkatan kembali pH pada hari kelima menunjukkan bahwa asam-asam organik yang dihasilkan dimanfaatkan sebagai substrat oleh jenis mikroba yang lainnya. Hal ini menunjukkan perubahan dominasi mikroba untuk setiap tahapan fermentasi. Dominasi pertumbuhan mikroba pada fermentasi growol dalam jangka waktu lima hari telah diteliti oleh Rascana (1986), yang menunjukkan jumlah mikroba yang terbesar (dominan) setiap harinya berturut-



Gambar 1. Perubahan pH pada air perendam kasava selama fermentasi kasava (0-120 jam)



Gambar 2. Perubahan jumlah bakteri penghasil asam selama fermentasi kasava (0-120 jam) dari sampel air perendam dan umbi kasava

turut sebagai berikut; pertama, *Streptococcus sp*, kedua, kelompok *Coryneform*, ketiga, *yeast* dan *Enterobacteriaceae*, *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp*, keempat, *Lactobacillus sp*, kelima, *Moraxella sp*. Seluruh mikroorganisme tersebut ada selama fermentasi pada jumlah yang bervariasi.

Perubahan jumlah BAL selama fermentasi menunjukkan terjadinya seleksi pertumbuhan yang dapat disebabkan karena perubahan pada kondisi fermentasinya. Faktor lingkungan relatif diatur stabil selama fermentasi, maka yang berpengaruh cukup besar adalah kondisi media, diantaranya adalah jumlah substrat dan pH. Awal fermentasi, jumlah nutrisi yang mudah dimetabolisme (glukosa) masih tinggi sehingga jumlah mikroba penghasil asam meningkat, selanjutnya glukosa habis digantikan dengan sumber karbon berupa pati. Mikroba yang tidak mampu memanfaatkan pati sebagai substrat akan mati sehingga jumlahnya pada air perendam turun. Mikroba yang menempel pada kasava kemungkinan lebih mudah beradaptasi dengan substrat berupa pati sehingga jumlahnya cenderung meningkat selama fermentasi. Jumlah mikroba penghasil asam yang tumbuh pada air perendam dan kasava pada jam ke-120 hampir sama jumlahnya, kondisi ini kemungkinan disebabkan karena kasava sudah mulai hancur dan tersuspensi pada air perendam.

### Karakteristik Isolat Selama Fermentasi Kasava pada Pembuatan Growol

Sebanyak 231 bakteri diisolasi dari air perendam dan kasava selama fermentasi kasava pada proses pembuatan growol. Sebanyak 63 isolat diantaranya adalah bakteri asam laktat dengan karakteristik gram positif, katalase negatif dan tidak menghasilkan gas saat ditumbuhkan pada substrat glukosa, serta didominasi jenis yang memiliki bentuk batang dengan panjang sel yang berbeda (Tabel 1). Jumlah isolat yang bukan merupakan bakteri asam laktat relatif tinggi, karena fermentasi yang dilakukan adalah fermentasi alami atau spontan sehingga berbagai jenis mikroba tumbuh terutama pada awal fermentasi. Selama fermentasi berlangsung akan terjadi perubahan kondisi media yang selanjutnya menjadi penyeleksi alami mikroba yang mampu beradaptasi terhadap perubahan tersebut. Jumlah isolat bakteri asam laktat dengan karakter yang



Tabel 1. Karakteristik isolat yang diisolasi dari perendaman kasava selama 0–120 jam

Karakteristik	Jumlah isolat*					
	Jam ke-0	Jam ke-24	Jam ke-48	Jam ke-72	Jam ke-96	Jam ke-120
Morfologi sel						
- batang	30	34	36	28	35	27
- bulat	8	3	3	1	1	2
Pewarnaan Gram						
- positif	24	16	17	18	23	13
- negatif	14	21	22	11	12	26
Katalase						
- positif	9	10	8	6	7	5
- negatif	29	27	31	23	29	24
Produksi Gas						
- positif	3	4	4	1	2	1
- negatif	35	33	35	28	34	28

\* Jumlah isolat merupakan hasil isolasi dari air perendam dan umbi kasava

diinginkan lebih banyak berasal dari kasava yang direndam dibanding air perendam, hal ini memberikan harapan bahwa isolat yang tumbuh adalah bakteri asam laktat yang memang memiliki kemampuan tumbuh dan memanfaatkan kasava sebagai substratnya.

Penelitian terdahulu tentang isolasi bakteri asam laktat dari produk pangan berbasis kasava menunjukkan menunjukkan hal yang sama. Fermentasi kasava pada pembuatan *fufu* di Afrika menunjukkan peran bakteri asam laktat dalam pembentukan aroma, penghambatan bakteri pembusuk dan patogen (Sobowale *et al.*, 2007). Potongan kasava terfermentasi pada pembuatan *gari* (makanan tradisional Afrika) juga telah diteliti oleh Anike dan Okafor (2008), yang menunjukkan bahwa hasil isolasi adalah *Lactobacillus sp.* yang merupakan jenis bakteri asam laktat yang tumbuh dominan.

#### Karakteristik Amilolitik Bakteri Asam Laktat

Sebanyak 63 isolat bakteri asam laktat diuji kemampuan tumbuhnya pada media dimana pati merupakan satu-satunya sumber karbon. Sebagian besar isolat (50 isolat) tidak mampu menggunakan pati sebagai substratnya sedangkan 13 isolat dapat tumbuh tetapi tidak memiliki zona bening yang jelas, yang menunjukkan bahwa kemampuan amilolitik isolat tersebut lemah. Akan tetapi pengujian amilolitik kuantitatif menunjukkan bahwa terdapat lima isolat dengan kemampuan degradasi pati yang cukup besar pada pengamatan 0–48 jam inkubasi, selain itu hampir semua isolat

memiliki kemampuan tumbuh pada pH rendah (Tabel 2).

Isolat bakteri asam laktat UB5.H5S4 memiliki kemampuan amilolitik yang tertinggi dibandingkan isolat yang lainnya. Terjadi penurunan jumlah pati yang cukup besar setelah fermentasi 24 jam yang menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam produksi enzim amilase. Reddy *et al.* (2008) menunjukkan beberapa strain *Lactobacillus spp.* menghasilkan amilase ekstraseluler dan memfermentasi pati secara langsung menjadi asam laktat. Hal ini disebabkan karena fermentasi dengan BAL amilolitik akan menggabungkan dua proses yaitu hidrolisis enzimatis substrat karbohidrat (pati) sekaligus fermentasi yang memanfaatkan gula yang dihasilkan menjadi asam laktat.

Kemampuan BAL dalam mendegradasi pati sangat dipengaruhi oleh karakter bakteri tersebut dan hal ini berkaitan dengan lingkungan isolat tersebut diperoleh. Seluruh isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat hasil isolasi dari proses fermentasi kasava pada pembuatan growol. Isolat UA10 adalah isolat yang diperoleh setelah 72 jam fermentasi kasava. Jumlah gula yang tersedia bagi pertumbuhan mikroba pada kondisi tersebut sudah banyak berkurang dan substrat utama yang tersedia adalah pati. Hal ini yang kemungkinan menyebabkan isolat tersebut memiliki kemampuan amilolitik tinggi,

Fermentasi menyebabkan terjadinya perubahan karakteristik pati yang disebabkan terjadinya penyerangan granula-

Tabel 2. Kemampuan tumbuh isolat BAL pada medium pati dan pH rendah

Kode Isolat*	Hidrolisis pati (absorbansi pada OD 585)**	Jumlah BAL (absorbansi pada OD 600)***		
		pH 3	pH 4	pH 5
UB7.H1S3	0.032	0.160	3.275	7.923
UB3.H3S4	-0.071*	0.066	1.696	7.238
AB10.H4S4	0.124	0.068	1.544	6.883
UB5.H5S4	-0.003*	0.027	1.432	5.139
AA4.H2S1	-0.033*	0.109	3.530	6.936
AA5.H6S3	-0.026*	0.021	1.732	8.086
UA2.H2S2	-0.07*	0.056	3.428	8.308
UA10.H5S4	0.022	0.067	1.800	8.580
AA1.H6S2	0.127	0.084	1.737	6.787
AA2.H3S3	0.039	0.083	1.733	7.736
AA2.H4S4	-0.087*	0.081	1.694	8.225
AB6.H3S3	-0.03*	0.116	1.662	6.809
AA15.H1S3	0.046	0.039	1.598	6.792
Kontrol	0.007	0.004	0.083	0.102

Keterangan :

\* Kode isolat

huruf A pertama menyatakan isolasi dari air perendam

huruf U menyatakan isolasi dari ubi kasava

huruf A kedua menyatakan isolasi dari batch fermentasi pertama (a)

huruf B menyatakan isolasi dari batch fermentasi kedua (b)

angka yang mengikuti huruf menunjukkan nomor isolat

\*\* isolat dengan kemampuan tumbuh pada medium pati, nilai negatif menunjukkan penurunan nilai absorbansi karena berkurangnya kepekatan warna iodine pada kadar pati yang lebih rendah

\*\*\*kemampuan tumbuh BAL pada pH rendah diukur berdasarkan kekeruhan medium yang menunjukkan bertambahnya jumlah BAL

granula pati oleh enzim sekaligus asam yang dikeluarkan oleh mikroorganisme yang terlibat (Marcon *et al.*, 2006). Degradasi pati oleh bakteri asam laktat terjadi karena sumber karbon dibutuhkan bagi pertumbuhannya sehingga bakteri menghasilkan enzim amilase ekstraselular. Enzim ini memecah ikatan polimer pati menjadi lebih pendek, oligosakarida atau molekul gula sederhana, sehingga uji iodine yang dilakukan menyebabkan terjadinya perubahan warna yang berbeda. Identifikasi diperkuat dengan hasil penggunaan iodine untuk mewarnai amilosa menunjukkan warna biru gelap, yang terjadi karena pembentukan kompleks. Kompleks tersebut terjadi akibat amilosa membentuk kumparan heliks disekeliling molekul iodine. Apabila polimer amilosa terputus menjadi lebih pendek maka terjadi perubahan ikatan kompleks dengan iodine sehingga warna menjadi lebih muda, merah, atau coklat (Murphy, 2000). Asam laktat juga dapat menyebabkan degradasi pati

selama fermentasi dengan mengoksidasi bagian amorf dan selanjutnya secara simultan menghidrolisis amilosa dan amilopektin. Waktu yang dibutuhkan asam laktat untuk mendegradasi pati lebih panjang dibandingkan pemutusan ikatan oleh enzim.

#### Identifikasi Bakteri Asam Laktat Amilolitik

Identifikasi menggunakan API 50 CHL dan interpretasi data menggunakan API *software* menunjukkan bahwa terdapat dua jenis spesies yang berbeda dari lima isolat yang memiliki karakter amilolitik (Tabel 3) yaitu *Lactobacillus rhamnosus* dan *Lactobacillus plantarum*. Isolat *Lactobacillus plantarum* mendominasi jenis isolat yang tumbuh pada perendaman kasava dibandingkan dengan jenis *Lactobacillus rhamnosus*. Jenis isolat yang sama ternyata memiliki kemampuan amilolitik yang berbeda-beda apabila diisolasi pada lama fermentasi yang berbeda pula (Tabel 2). Berdasarkan pengamatan pertumbuhan selama fermentasi, *L.*

Tabel 2. Hasil identifikasi isolat dengan API 50 CHL

Kode Isolat*	Hasil identifikasi**	Tingkat akurasi **
UB7.H1S3	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
UB3.H3S4	<i>L. plantarum</i> 1	99.8% Doubtful
AB10.H4S4	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Doubtful
UB5.H5S4	<i>L. rhamnosus</i>	99.3%, Very good
AA4.H2S1	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
AA5.H6S3	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
UA2.H2S2	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
UA10.H5S4	<i>L. rhamnosus</i>	99.9%, Good
AA1.H6S2	<i>L. rhamnosus</i>	99.9%, Doubtful
AA2.H3S3	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
AA2.H4S4	<i>L. plantarum</i> 1	99.9%, Excellent
AB6.H3S3	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i>	96.7%, very good identification to the genus 3.20%
AA15.H1S3	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i>	87.4%, good identification to the genus 12.50%

Keterangan:

\* Kode isolat

huruf A pertama menyatakan isolasi dari air perendam  
 huruf U menyatakan isolasi dari ubi kasava  
 huruf A kedua menyatakan isolasi dari batch fermentasi pertama (a)  
 huruf B menyatakan isolasi dari batch fermentasi kedua (b)  
 angka yang mengikuti huruf menunjukkan nomor isolat

\*\* Identifikasi dilakukan pada lama inkubasi 24 dan 48 jam, hasil identifikasi dan tingkat akurasi diperoleh berdasarkan pengisian perubahan warna pada media API 50 CHL

*rhamnosus* mulai tumbuh pada hari kedua fermentasi. Pada saat tersebut jumlah gula sederhana pada kasava sudah menurun dan mikroba yang tumbuh adalah yang mampu memanfaatkan pati sebagai sumber karbon. Adapun *L. plantarum* yang tumbuh mulai awal hingga akhir fermentasi dapat memiliki kemampuan amilolitik sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan media.

Jenis dan kondisi media menjadi penentu jenis dan kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasi atau menggunakan pati sebagai substrat bagi pertumbuhannya. Hal ini menjadi penyebab beragamnya jenis isolat amilolitik yang diisolasi dari jenis media atau bahan yang berbeda. Spesies *L. manihotivorans* diisolasi dari fermentasi pati kasava (Guyot dan Guyot-Morlon, 2001), *L. amylovorus* dari jagung (Nakamura, 1981), *L. plantarum* dari kentang dan kasava (Giraud *et al.*, 1994), *Lactobacillus fermentum* dari (Agati *et al.*, 1998; Sanni *et al.*, 2002) dan *L. amylophilus* dari substrat yang diperoleh dari bahan berpati lainnya (Naveena *et al.*, 2003; Vishnu *et al.*,

2002). Penelitian Kostinek *et al.* (2007) juga menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang dominan tumbuh pada fermentasi gari (kasava terfermentasi) adalah kelompok bakteri asam laktat jenis *Lactobacillus plantarum* spp, sedangkan *Weissella* dan *Leuconostoc* adalah jenis bakteri yang dominan berikutnya.

## SIMPULAN

Perendaman kasava pada pembuatan growol yang berlangsung selama 1-5 hari merupakan proses fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat dengan kemampuan amilolitik yang berbeda. Jenis bakteri asam laktat hasil isolasi didominasi oleh *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus rhamnosus* berdasarkan identifikasi menggunakan kit API 50 CHL. Kondisi media dan lama fermentasi terbukti mempengaruhi jenis bakteri asam laktat yang tumbuh dan kemampuannya dalam mendegradasi pati. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan metode identifikasi yang lebih akurat dan aplikasi bakteri asam

laktat hasil isolasi ini dalam memfermentasi pati kasava mentah.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Doktor Tahun 2009 melalui Dana DIPA Universitas Gadjah Mada.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agati VJP, Guyot J, Morlon-Guyot P, Talamond, and Hounhouigan D.J. 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J Appl Microbiol* 85:512-20
- Anike N and Okafor N. 2008. Secretion of Methionine by microorganism associated with cassava fermentation. *African Journal of Food Agri. Nutr. and Development* 8: 77-90
- Camargo C, Colona P, Buleon A, and Molard D.R. 1988. Functional Properties of Sour Cassava (*Manihot utilissima*) Starch: Polvilho Azedo." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 429-435
- De Man JC, Rogosa M, and Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135
- Demiante LM, Dupuy N, Huvenne JP, Cereda MP, and Wosiacki G. 2000. Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymer* 42: 149-158
- Giraud E, Champaviller A, and Raimbault M. 1994. Degradation of raw starch by a wild amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 4319-23
- Guyot JP and Morlon-Guyot J. 2001. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32T, an amyolytic *Lactobacillus* isolatd from sour starch cassava fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 67: 217-225
- Guyot JP, Brizuela MA, Rodriguez-Sanoya R, and Morlon-Guyot J. 2003. Characterization and differentiation of *Lactobacillus manihotivorans* strains isolatd from cassava sour starch. *International Journal of Food Microbiology* 87: 187-192
- Johansson ML, Sanni A, Lonner C, and Molin G. 1995. Phenotypically-based taxonomy using API 50 CH of *lactobacilli* from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int J Food Microbiol* 25:159-68
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S, Dortu C, Thonart P, Taljaard L, Mengu M, Franz CMAP, and Holzapfel WH. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 114: 342-351
- Lacerda ICA, Miranda RL, Borelli BM, Nunes AC, Nardi RMD, Lachance MA, and Rosa CA. 2005. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 105: 213-219
- Marcon MJA, Vieira MA, Santo K, De Simas KN, Amboni RDMC, and Amante ER. 2006. The effect of fermentation on cassava starch microstructure. *Journal of Food Process Engineering* 29: 362-372
- Morlon-Guyot J, Guyot JP, Pot B, de Haut IJ, and Raimbault M. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolatd from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1101-1109
- Murphy P. 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, New York
- Muttarokah. 1998. Lactic Acid Bacteria in Fermented Food of Yogyakarta. Scription. Faculty of Agricultural Technology. Gadjah Mada University, Yogyakarta
- Nakamura LK. 1981. *Lactobacillus amyolyticus*: a new starch hydrolyzing spesies from swine waste corn fermentation. *Dev Ind Microbiol* 20: 531-40
- Rascana AP. 1986. Microflora in Traditional Growol Fermentation. Scription. Faculty of Agricultural Technology, Gadjah



- Mada University. Yogyakarta
- Naveena BJ, Vishnu C, Altaf Md, and Reddy G. 2003. Wheat bran an inexpensive substrat for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions, crystalline and pasting properties of cassava starch are influenced by its molecular properties. *Sci Ind Res* 62: 453-456
- Ngatirah. 2000. Seleksi Bakteri Asam Aktat sebagai Agensia Probiotik Yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol. Tesis S-2. Pascasarjana. UGM, Yogyakarta
- Nwankwo D, Anadu E, and Usoro R. 1989. Cassava fermenting organisms. *MIRCEN Journal* 5: 169-179
- Olympia M, Fukuda H, Ono H, Kaneko Y, and Takano M. 1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolatd from a fermented fish and rice food, "Burong Isda," and its amyolytic enzyme. *J Ferment Bioeng* 80: 124-130
- Petrov K, Urshev Z, and Petrova P. 2008. L(+)-lactic acid production from starch by a novel amyolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology* 25: 550- 557
- Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, and Kumar EV. 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation, a review. *Biotechnology Advances* 26: 22-34
- Sanni A, Morlon-Guyot J, and Guyot JP. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolatd from different Nigerian traditional fermented foods. *Int J Food Microbiol* 72:53-62
- Sobowale AO, Olurin TO, and Oyewole OB. 2007. Efffect of lactic acid bacteria starter culture fermentation of cassava on chemical and sensory characteristics of fufu flour. *African Journal of Biotechnology* 6(16): 1954 - 1958
- Vishnu C, Seenayya G, and Reddy G. 2002. "Direct fermentation of various pure and crude starchy substrats to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 429-433