

AKTIVITAS ANTIBAKTERI NIRA LONTAR TERFERMENTESI DENGAN VARIASI LAMA WAKTU FERMENTASI TERHADAP BAKTERI GRAM POSITIF (*Staphylococcus aureus*) DAN GRAM NEGATIF (*Escherichia coli*)

(Antibacterial Activity of Fermented Nira Lontar with Variation of Fermentation Time Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli)

Erda Eni Rame Hau, Eni Rohyati

Dosen Program Studi Kesehatan Hewan,
Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Kupang, Indonesia

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of spontaneous fermented nira with different treatment time to gram positive and gram negative bacteria. The research was conducted in November 2017 at the Animal Health Laboratory, Kupang State Agricultural of Polytechnic and Veterinary Public Health Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Nusa Cendana University, Kupang, NTT. Samples of bacteria used in this study were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The fermented of nira lontar from 4 fermentation time (1 day (N1), 2 days (N2), 3 days (N3), and 4 days (N4)) were then collected to test the antimicrobial activity in inhibiting the growth of the microorganism. Fermentation was carried out for 4 days because previous research showed that the optimum growth of lactic acid bacteria in fermented palm was on the 4th day. This study used the Kirby-Bauer disc method, in which antibacterial activity was described by the diameter of the inhibition zone. The results showed that the mean diameter of the inhibitory zone of *S. aureus* with N1 material was 8.15 mm, while N2, N3, and N4 had the same diameter of 6.4 mm. There was a significant difference between the diameter of the N1 zone and the rest of the samples, as well as all treatments with Ciprofloxacin positive control antibiotics. Different trends were indicated by *E. coli*, where there were no significant differences between N1, N2, and N3 diameters with values of 9.2 mm, 8.95 mm, and 8.1 mm, respectively, but they were significantly different from the diameter N4 of 6.4mm, and all treatments were significantly different with Ciprofloxacin positive control antibiotics. It can be concluded that spontaneous fermented nira lontar at four different fermentation time intervals have antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, with statistically significantly different inhibitory activity among different fermentation days. Moreover, fermented nira lontar has higher inhibitory activity on gram-negative bacteria, *E. coli* compared to gram-positive bacteria, *S. aureus*.

Keywords: nira lontar, antimicrobial activity, lactic acid bacteria, fermentation.

PENDAHULUAN

Bahan pengawet diperlukan agar makanan tahan lama, tanpa menurunkan kualitas makanan, misalnya produk

daging. Daging segar mengandung bakteri yang berasal dari peralatan, proses pengolahan, pekerja dan air.

Daging yang tercemar bakteri patogen akan berbahaya bila dikonsumsi karena akan menimbulkan penyakit, untuk itu perlu dilakukan adanya proses pengawetan. Proses pengawetan harus dilakukan secara aman tanpa menurunkan kualitas daging, mengingat tingginya nilai nutrisi dalam daging yang penting bagi manusia. Penelitian untuk mendapatkan pengawet alami, perlu dilakukan karena sebagian besar bahan pengawet yang beredar merupakan zat kimia yang bersifat tidak aman bagi tubuh. Pengawet alami adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh bahan alam, yang dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan bakteri.

Salah satu bahan alam yang berpotensi mempunyai aktivitas sebagai pengawet alami adalah nira lontar, cairan yang dihasilkan dari mayang bunga jantan pohon lontar (*Borassus fiabellifer*). Nira mengandung banyak gula, sekitar 13% dan komponen nutrisi lain yang sangat potensial untuk ditumbuhi mikroorganisme. Setelah beberapa jain turun sadap, cairan nira akan mulai mengalami fermentasi spontan yang melibatkan berbagai jenis bakteri asam laktat (Hidayati, 2009). Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan oleh manusia dalam proses pengolahan bahan pangan melalui proses fermentasi. BAL yang terlibat dalam proses fermentasi ini memberikan kontribusi yang besar terhadap masa simpan produk serta perbaikan aroma, rasa dan tekstur. Efek pengawetan yang ditimbulkan oleh BAL umumnya disebabkan oleh penurunan pH pada lingkungan fermentasi, dimana hal itu akan mencegah pertumbuhan mikroba lain yang tidak dikehendaki selama fermentasi berlangsung (Salminen *et al.*, 2004).

Selain karena penurunan pH, BAL juga diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen dengan memproduksi senyawa antibakteri seperti asam-asam organik (laktat, asetat dan format), bakteriosin, CO₂, diasetil dan H₂O₂. Kultur BAL yang diisolasi dari beberapa pangan terfermentasi telah diteliti mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen dan pembusuk (Salminen *et al.*, 2004). Nurmiati (2006) menyatakan bahwa BAL dan bakteri asam asetat yang diisolasi dari nira lontar memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *S. typhi* dan *Bacillus* sp. Sampai saat ini, BAL indigenus dari nira lontar belum diteliti secara mendalam untuk dimanfaatkan sebagai sumber isolat yang berpotensi sebagai biopreservative (pengawet hayati).

Antibakteri merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks *et al.*, 2007).

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Disc diffusion test atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (clear zone) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu 10⁵-10⁸ CFU/mL (Hermawan *et al.*, 2007 dalam Dewi, *et al.*, 2014). Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode

lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dengan melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana aktivitas antibakteri nira lontar terhadap bakteri gram positif dan negative yaitu *S. aureus* dan *E. coli*, sehingga dapat dilihat potensinya sebagai alternatif bahan pengawet alami.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk mengedukasi masyarakat bahwa nira lontar yang

melimpah di NTT dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif. Selain itu, memberikan keterangan akan bahaya bahan pengawet makanan yang berupa bahan kimia banyak beredar di masyarakat seperti formalin, memberitahukan bahwa daging segar dengan mudah terkontaminasi bakteri. Hasil penelitian ini juga dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam penelitian ke depannya untuk pengembangan kualitas dan nilai tambah untuk produk peternakan.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2017 di Laboratorium Kesehatan Hewan Politeknik Pertanian Negeri Kupang dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana, Kupang, NTT.

Materi penelitian berupa nira lontar yang berasal dari penyadap dan biakan murni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang didapat dari BPOM Kota Kupang. Bahan lainnya yang digunakan adalah Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), blank disc, disc antibiotik, aquadest, alkohol 70%, spiritus.

Peralatan yang digunakan di antaranya adalah mikropipet 1.000 ul, mikropipet 10 ul, tip mikropipet 1.000 ul, tip mikropipet 10 ul, timbangan analitik, inkubator, Oven, hot plate stirer, autoclave, lemari es, cawan petri steril, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi,

gelas ukur, pinset steril, pengaduk, termometer, vortex dan bunsen.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah Disc diffusion test atau uji difusi disk dengan metode cakram kertas. Uji ini dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (clear zone) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam nira lontar terfermentasi.

Pelaksanaan penelitian terbagi menjadi dua tahap yaitu (1) Fermentasi nira lontar pada 4 interval waktu yang berbeda (2) Uji aktivitas antimikroba terhadap nira lontar terfermentasi.

Fermentasi Nira Lontar

Nira lontar yang baru dikoleksi dari petani lontar dibirakan terfermentasi spontan pada suhu ruang dengan empat interval waktu yang berbeda, 1 hari, 2 hari, 3 hari, dan 4 hari. Hasil fermentasi

nira lontar dari 4 hari berbeda tersebut yang kemudian digunakan untuk diuji aktivitas antimikrobanya.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dilakukan dengan cara dengan memasukkan nutrient broth ke dalam tabung kemudian kuman yang diambil secara aseptis dimasukkan ke dalam tabung tersebut dan dihomogenkan. Kekeruhan nutrient broth di dalam tabung disesuaikan dengan Standard McFarland sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan McFarland 0.5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Cara pengukuran tingkat kekeruhan dengan cara membandingkan secara berdampingan. Kekeruhan dinilai dengan cara dibandingkan dengan latar belakang kertas putih dengan garis hitam kontras yang dilakukan oleh dua pengamat di ruangan yang terang. Jika kurang keruh, suspensi dapat ditambahkan koloni bakterisampai didapat tingkat kekeruhan yang sama antara dua pengamat.

Pembuatan Media Agar NA

6 gr Nutrient Agar ditimbang kemudian dilarutkan dalam 250 ml

aquadest. Media dipanaskan hingga mendidih, kemudian disterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm suhu 121° C. Setelah diautoklaf, agar langsung dituangkan ke dalam cawan petri dan didinginkan hingga agar beku.

Uji Aktivitas Antimikroba

Blank disk diletakkan di atas medium NA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji *E.coli* dan *S.aureus*. Di atas blank disc yang telah dilabel kemudian diteteskan sebanyak 10 μ l masing-masing sampel nira terfermentasi (N1, N2, N3, N4).

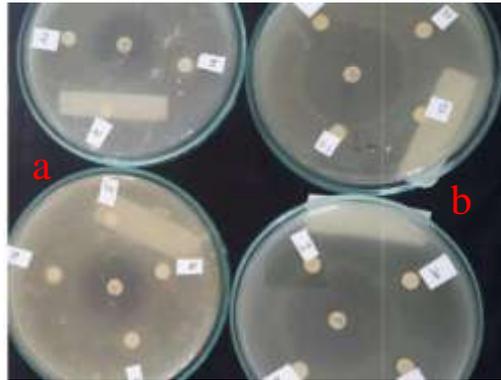
Pengamatan aktivitas antibakteria dilakukan setelah sampel diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37° C. Aktivitas antibakteria dari nira terfermentasi ditandai dengan ada atau tidak zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang telah diteteskan nira terfermentasi dengan interval waktu yang berbeda. Jarak zona bening dengan nira terfermentasi yang ada di kertas cakram diukur dalam milimeter. Besar kecilnya diameter zona hambat menunjukkan tinggi rendahnya kemampuan nira lontar terfermentasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri nira lontar terfermentasi terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Apabila aktivitasnya dapat menghambat atau membunuh bakteri, maka ke depannya dapat dilakukan penelitian lanjutan tentang kemungkinannya untuk

diaplikasikan sebagai bahan pengawet makanan alami.

Hasil uji aktivitas antibakteri dan hasil pengukuran zona hambat pengaruh nira lontar terfermentasi pada *S.aureus* dan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Gambaran Diameter Hambatan Nira terfermentasi terhadap *S. aureus* (a) dan *E.coli* (b)

Tabel 1. Diameter Hambatan Hasil Uji Aktifitas Mikroorganisme Nira Lontar Terfermentasi terhadap *S.aureus* dan *E. Coli*

Nira lontar difermentasi (hari)	Diameter zona hambatan (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
1	8.15	9.2
2	6.4	8.95
3	6.4	8.1
4	6.4	6.4
Kontrol (Ciprofloxacin)	26.05	40.95

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa daya hambat mikroorganisme nira lontar terfermentasi terhadap *Staphylococcus aureus* pada nira terfermentasi hari pertama lebih besar dan berbeda nyata dengan nira hasil fermentasi 3 hari berikutnya. Diameter zona hambat dari keempat bahan tersebut juga berbeda nyata dengan diameter hambatan Ciprofloxacin yang dalam hal ini digunakan sebagai kontrol positif.

Untuk bakteri *Escherichia coli* daya hambat dari nira lontar nira lontar yang terfermentasi pada 3 hari pertama tidak berbeda nyata satu dengan yang lain sekalipun angka yang ditunjukkan

menunjukkan tren menurun, dan diameter ketiganya berbeda nyata dengan diameter nira terfermentasi 4 hari. Sama halnya dengan hasil *S. aureus*, diameter keempatnya juga berbeda nyata dengan kontrol positif.

Hasil ini tidak mendukung hasil penelitian kami sebelumnya yang menguji potensi nira sebagai bahan pengawet alami melalui uji Total Plate Count (TPC) daging sapi yang diberi perlakuan nira lontar hasil fermentasi dengan perlakuan yang sama dengan kali ini. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa jumlah koloni mikroorganisme pada daging yang diberi perlakuan

dengan nira hasil fermentasi 4 hari lebih rendah dibanding 3 hari sebelumnya, dan demikian selanjutnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang terbentuk pada nira terfermentasi 4 hari lebih mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, yang mana tidak sejalan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan hasil bahwa nira ini memiliki daya hambat yang paling rendah baik pada *S. aureus* maupun *E. coli*.

Penentuan kriteria kekuatan daya antibakteri berdasarkan Davis dan Stout (1971) adalah sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan 5-10 mm kategori sedang, dan daerah hambatan 5 atau kurang termasuk kategori lemah. Berdasarkan kriteria ini maka dapat disimpulkan bahwa nira lontar baik yang terfermentasi 1 hari sampai 4 hari memiliki daya antibakteri sedang, yaitu berada pada kisaran 5-10 mm.

Untuk rata-rata daya hambat mikroorganisme nira lontar terhadap kedua bakteri yang digunakan didapatkan bahwa rata-rata diameter daya hambat pada *E. coli* lebih besar yaitu sebesar 8,16 mm dibanding diameter hambat pada *S.aureus* yaitu sebesar 6,84 mm. Penghambatan BAL terhadap bakteri patogen dipengaruhi oleh perbedaan dinding sel dan lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel. Peptidoglikan bakteri gram negatif hanya 1-2% dari berat kering. Membran luarnya tersusun atas lipoprotein 30%, fosfolipid 20- 25%, protein 40-45% yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap lingkungan luar dan terhadap antimikroba yang dihasilkan BAL (Prescott *et al.*, 2002).

Semakin tipis lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel dan perbedaan dinding sel bakteri patogen maka bakteri tersebut semakin sensitif terhadap BAL.

Penghambatan BAL terhadap *E. coli*, dilakukan dengan merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis atau menghambat pertumbuhan dinding sel pada sel bakteri yang sedang tumbuh. Selain itu penghambatan juga dilakukan dengan merubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi di dalam sel, penghambat sintesis protein dan asam nukleat dengan cara mendenaturasikan protein dan asam nukleat, menghambat kerja enzim intraselluler sehingga mengganggu metabolisme sel (Pelezar and Chan, 2008).

Perbedaan struktur dinding sel menentukan penetrasi, ikatan dan aktivitas senyawa antibakteri (Jawetz *et al.*, 2005). Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan lebih banyak peptidoglikan, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida (asam teikoat). Hal ini yang menyebabkan daya hambat nira terfermentasi terhadap *S.aureus* lebih kecil dari *E.coli*.

Hasil ini menegaskan hasil penelitian Ammor *et al* (2006) yang menjelaskan tentang aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat yang berperan dalam melawan bakteri pembusuk dan patogen. Tetapi hasil ini tidak mendukung hasil penelitian Cahyaningsih (2005), yang menunjukkan bahwa total asam laktat yang diproduksi oleh nira lontar terfermentasi spontan mencapai jumlah tertingginya pada hari ke-4 dan jumlah bakteri asam laktat mulai menurun jumlahnya sesudah itu.

KESIMPULAN DAN SARAN

Uji aktivitas antibakteri pada *S.aureus* dan *E.coli* menunjukkan hasil yang tidak mendukung penelitian sebelumnya tentang nira lontar. Nira terfermentasi menunjukkan daya hambat tertinggi oleh nira 1 hari fermentasi pada kedua mikroorganisme dan kemudian lebih rendah daya hambatnya oleh nira hari selanjutnya. Akan tetapi hasil lain yang didapat adalah bahwa nira terfermentasi memiliki daya hambat mikroorganisme lebih besar pada bakteri Gram Negatif, yang dalam penelitian ini adalah *E.coli*.

Melihat potensi yang dimiliki oleh nira lontar sebagai pengawet alami, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai beberapa faktor penting lain yang berpengaruh pada daya kerja antimikroba dari bakteri asam laktat yang dihasilkan oleh nira terfermentasi. Penelitian lanjutan yang dapat dilakukan adalah bagaimana aktifitas antibakteri nira lontar terhadap mikroorganisme lain, yang kemudian mungkin dapat menjawab ketidakcocokan hasil yang didapat sekarang dan penelitian sebelumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- 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: behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control* 17: 462–468.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, & Morse SA. (2007). *Medical Microbiology*. London:McGraw-Hill Medical.
- Cahyaningsih HE. (2005). Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar Serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella Typhmuriium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. Skripsi. IPB: Bogor.
- Davis WW & TR Stout. (1971). Disc Plate Methode of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiol.* 22: 659-665.
- Dewi AAS, Nurlatifah I, Widdhiasmoro, NP, Riti N, dan Purnawati D. (2014). Prevalensi Cemar Mikroba dan Residu Antibiotika pada Pangan Asal Hewan (PAH) di Provinsi Bali, NTB, dan NTT Tahun 2013. *Buletin Veteriner, BBVet Denpasar* Vol. XXVI No. 84.
- Hidayati N. (2009). Manfaat Pohon Aren. Diakses dari <http://niahidayati.net> pada 18 Mei 2017.
- Jawetz E, JL Melnick, & EA Adelberg. (2001). *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Mikrobiology)* Diterjemahkan oleh H. Tomang. Jakarta: Penerbit EGC.
- Kusmiyati NWS & Agustini. (2007). Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri

- dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas* 8 (1): 48-53.
- Nurmiati. (2006). Kajian Fisiologis dan Perkembangan Bakteri-bakteri Asam Laktat Pada Beberapa Medium Cair Dalam Pengadaan Bank Mikroba.
- Pelczar MJ & ECS Chan. (1988). *Dasar-dasar Mikrobiologi* 2. Jakarta: UI Press.
- Rahayu S & Djaafar TF. (2007). Cemaran Mikroba pada Produk Pertanian, Penyakit yang Ditimbulkan, dan Pencegahannya. *Jurnal Litbang Pertanian* 26(2):67-75.