ISOLASI DAN SELEKSI BAKTERI AMILOLITIK PENYEBAB KEMASAMAN PADA TEPUNG SAGU BASAH HASIL PENYEDIAAN SECARA TRADISIONAL

Tri Gunaedi[1], S.Margino[2], L. Sembiring dan R. Pratiwi[3]

[1.]Fak.MIPA Universitas Cenderawasih Jayapura,[2]. Fak.Pertanian Universitas Gadjah Mada
[,3]. Fak.Biologi Universitas Gadjah Mada.

Abstrak

Kemasaman pada tepung sagu basah disebabkan karena adanya asam organik hasil perombakan tepung yang dilakukan oleh bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri amilolitik penyebab kemasaman berdasarkan seleksi kemampuan amilolitik dan penghasilan asam organiknya. Sumber isolat diambil dari tempat penyediaan tepung sagu basah di Jayapura dan sekitarnya. Kemampuan amilolitik ditentukan dengan uji amilolitik menggunakan reagen iodium sedangkan analisa asam organik dilakukan menggunakan perangkat gas kromatografi. Isolasi menghasilkan 114 isolat bakteri amilolitik penghasil asam organik. Sebagian besar isolat amilolitik mampu menghasilkan asam laktat dengan kadar lebih tinggi dibanding empat jenis asam organik lainnya. Meskipun demikian bau masam pada tepung sagu bukan hanya disebabkan oleh kehadiran asam laktat saja tetapi juga oleh adanya asam asetat, propionat dan butirat sebagai produk fermentasi bakteri amilolitik.

Kata kunci*:* Bakteri amilolitik, kemasaman dan tepung sagu basah

PENDAHULUAN

Tepung sagu basah merupakan tepung sagu hasil pengolahan secara tradisional dikerjakan dengan menggunakan medium air sebagai pelarut dan pengendap, sehingga tepung yang dihasilkan masih dalam kondisi basah. Pada umumnya tepung sagu basah yang dipasarkan berbau masam sehingga kurang menarik dibandingkan sumber karbohidrat lainnya seperti beras, ubi jalar dan lainnya. Meskipun demikian masih banyak masyarakat pedesaan di daerah Papua mengkonsumsi tepung sagu sebagai makanan pokok kesehariannya, sehingga perlu kiranya diperhatikan masalah kemasaman yang terjadi pada tepung sagu basah.

Kemasaman yang terjadi pada tepung sagu basah hasil penyediaan secara tradisional di daerah Papua, disebabkan oleh bakteri amilolitik yang berasal dari lingkungan tempat penyediaan.. Penyediaan tepung sagu secara tradisional belum begitu memikirkan aspek kebersihan. Oleh karena itu memungkinkan masuknya berbagai jenis bakteri baik dari air maupun tanah sekitar tempat penyediaan, hal ini menyebabkan kualitas tepung sagu menjadi rendah (Ahmad, *et.al,* 1999). Rendahnya kualitas tepung sagu, diantaranya ditandai bau asam dan berlendir (Joe, 1996).

Bau asam pada tepung sagu basah disebabkan karena adanya asam organik hasil proses fermentasi tepung sagu yang dilakukan oleh bakteri amilolitik Asam-asam organik yang dihasilkan memberikan bau asam pada tepung sagu basah dan kemungkinan kadar dan jenisnya bervariasi tergantung pada jenis bakteri yang terlibat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah hasil penyediaan secara tradisional berdasarkan daya amilolitik dan produksi asam organiknya.

Manfaat dari penelitian ini, memberikan informasi kepada dunia ilmu pengetahuan tentang kemasaman yang terjadi pada tepung sagu basah yang disebabkan karena adanya asam organik hasil fermentasi yang dilakukan oleh bakteri amilolitik. Mendapatkan isolat unggul penghasil asam organik terbesar yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai agen dalam indusdtri berbasis asam organik dengan substrat terbarukan.

METODE PENELITIAN

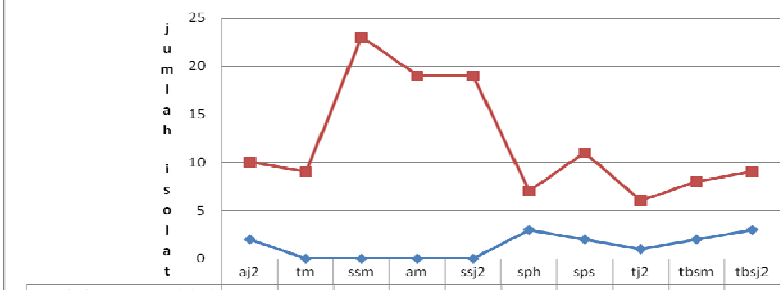
Sampel diperoleh dari tempat penyediaan tepung sagu secara tradisional di desa Maribu dan Kampung Jembatan Dua Jayapura, berupa tanah, air limbah penyaringan tepung sagu, tokokan/parutan batang sagu, tepung sagu hasil pengendapan serta tepung sagu basah yang dipasarkan di pasar Sentani dan Pasar Hamadi Jayapura. Isolasi bakteri amilolitik dilakukan dengan menggunakan medium *nutrient agar* + 3 g/l pati terlarut dengan metode pour plate (Harry, et.al.,1981),. Setelah isolat didapat kemudian diseleksi berdasarkan daya amilolitiknya dengan menginokulasikan isolat ke dalam medium pati agar. Setelah masa inkubasi 24 jam pada suhu ruangan, kultur ditetesi dengan iodine 0,2% dalam 2% kalium iodida hingga terbentuk zona bening yang menandakan isolat bersifat amilolitik. Nilai daya amilolitik diperoleh dengan membagi diameter zona terang dengan diameter koloni (Linquist, 2001). Isolat yang bersifat amilolitik selanjutnya diuji kemampuan produksi asam organiknya dengan menginokulasikannya ke dalam 5 ml medium fermentasi berupa *nutrient broth* dengan penambahan substrat 3g/l tepung sagu. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruangan, setelah masa inkubasi 2 ml kultur dipindahkan ke tabung reaksi bertutup ulir selanjutnya ditambah 0,2ml asam sulfat 96% dan 1ml dietil eter p.a, suspensi divortex dan diinapkan 24 jam pada suhu -20°C. Setelah masa inkubasi, terbentuk lapisan eter, lapisan ini kemudian dianalisa menggunakan perangkat gas kromatografi Hawlett Packard 5890 Series II dengan kolom gelas kapiler HP5 (5% Phenyl Methyl Siloxane). Sebelum sampel diinjeksikan, terlebih dahulu diinjeksikan 1µl standard asam organik (asetat, propionat, butirat dan laktat) satu persatu untuk melihat *retention time* setiap standard asam organik yang digunakan , selanjutnya diinjeksikan 0,1µl campuran standard asam organik. Setelah didapat grafik campuran asam organik, kemudian setiap sampel diinjeksikan. Jenis asam organik yang terdapat dalam sampel dapat ditentukan dengan menyamakan *retention time* standard asam organik dengan sampel (Atlas,*et.al*,1984). Sedangkan, untuk menentukan kadar asam organik setiap sampel menggunakan formula, mg/l asam organik = luas kurva sampel/ luas kurva standard x konsentrasi standard (Scott, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan daya amilolitik

Isolat bakteri yang berasal dari berbagai titik tempat penyediaan tepung sagu berjumlah 133 isolat, setelah dilakukan pengujian daya amilolitiknya didapat 120 isolat memiliki daya amilolitik dengan kisaran rasio amilolitik sebesar 1,00 - 7,50.(Gb.1). Adanya bakteri bersifat amilolitik dan non amilolitik ini dikarenakan tepung sagu basah tidak hanya tersusun atas amilum dalam jumlah besar 79-88%, tetapi juga masih mengandung padatan terlarut 6-12% dan abu 1-3% (Cecil *et.al* in Pei-Lang *et.al*., 2005). Isolat bakteri banyak didapatkan dari sampel tepung sagu (tabel.1), sampel sagu segar maribu (SSM; 23 isolat) dan sagu segar dari jembatan dua (SSJ2:19 isolat), sedangkan dari air limbah (AM dan AJ2), tanah sekitar pengolahan (TM dan TJ2), tokokan batang sagu (TBSM dan TBSJ2) serta sagu yang tengah dipasarkan di pasar Hamadi (SPH) dan pasar Sentani (SPS) jumlah isolat bakteri amilolitiknya lebih sedikit.

Tabel 1. Isolat bakteri amilolitik dan non amilolitik dari tepung sagu basah dan tempat penyediaannya



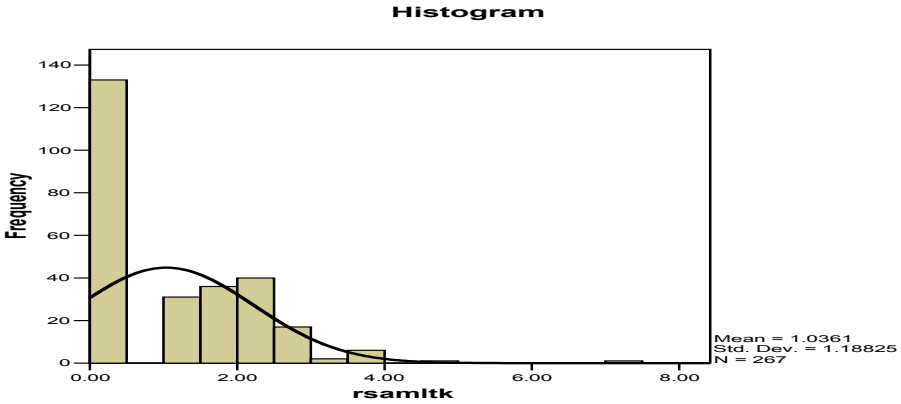
	aj2	tm	ssm	am	ssj2	sph	sps	tj2	tbsm	tbsj2
bakteri non amilolitik	2	0	0	0	0	3	2	1	2	3
bakteri amilolitik	10	9	23	19	19	7	11	6	8	9

Hal tersebut dikarenakan pada sampel tepung sagu mengandung amilum yang diperlukan oleh bakteri amilolitik untuk substrat fermentasinya dalam menghasilkan produk asam organik.

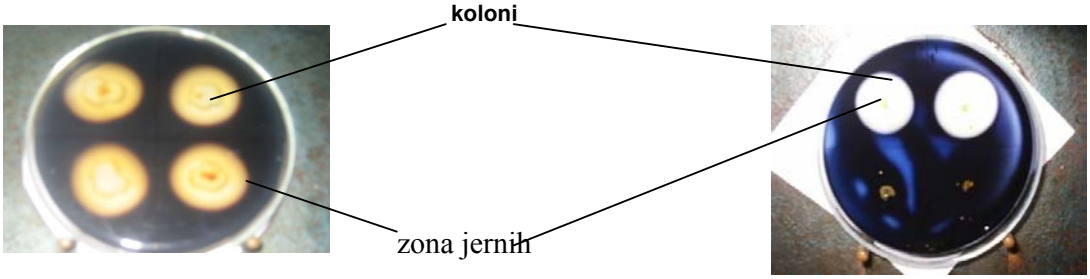
Sedangkan pada sumber isolat tanah dan air limbah, jumlah isolat bakteri amilolitik jumlahnya sedikit hal ini dikarenakan tepung sagu pada saat diolah berada dibagian bawah kolam pengendapan yang terbuat dari kain terpal kedap air sehingga tepung sagu tidak keluar, adanya isolat bakteri amilolitik di tanah dan air limbah dapat tumbuh karena dapat sumber karbon dari tepung sagu yang terlarut dan tumpahan saat air limbah dikeluarkan dari kolam pengendapan. Sebagai strain acuan dalam pengujian kemampuan amilolitik ini yaitu *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 dengan rasio amilolitik 2,62.(Gb.2). Pemilihan strain acuan tersebut dikarenakan, strain bakteri itu berkemampuan amilolitik dalam merombak tepung dan ampas sagu (Apun, *et.al*, 2000). Tepung sagu oleh isolat amilolitik difermentasi menjadi berbagai jenis asam organik. Asam organik yang dihasilkan tergantung pada jalur fermentasi yang digunakan oleh isolat.

Jenis bakteri yang telah ditemukan dari tepung sagu misalnya dari jenis faecal coliform, *Escherichia coli, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Salmonella spp, dan Staphylococcus aureus* (Grenhill, *et.al*., 2008). Keberadaan bakteri pada tepung sagu basah dapat terjadi, dikarenakan pada saat dilakukan proses pengolahan tokokan empulur batang sagu dibutuhkan banyak air. Air diperoleh disekitar tempat pengolahan, dapat dari sungai, kolam, saluran air kecil ataupun sumur buatan temporer dimana faktor kebersihan air belum begitu diperhatikan yang penting jernih namun belum tentu bersih.

Isolat bakteri amilolitik yang memiliki rasio daya amilolitik lebih dari 2 selanjutnya dianalisa produksi asam organiknya, sedangkan isolat yang memiliki rasio kurang dari 2 dipilih berdasarkan sumber pengambilan isolat, jumlah total yang dianalisis sebanyak 75 isolat.



Gambar 1. Hasil pengujian kemampuan amilolitik



Gambar 2. Kemampuan amilolitik strain *Bacillus amyloliquefaciens* **IFO 14141**

Gambar 3. Kemampuan amilolitik isolat **mikroorganisme dari tepung sagu** basah

Analisa asam organik

Tabel 2. Deskriptif statistik penghasilan asam organik

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ASETAT	75	,0000000	,5470000	,019966667	,0673147535
PROPNT	75	,0000000	2,6270000	,109956000	,3820230230
BUTIRAT	75	,0000000	,5470000	,040921333	,1018569841
LAKTAT	75	,0000000	103,4530000	7,775557333	21,4815645087
Valid N (listwise)	75				

Analisa produksi asam organik terhadap tujuh puluh lima isolat bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah, didapatkan ; 39,7% (28) isolat menghasilkan asetat dengan kadar tertinggi 0,55mg/l; 53,8% (39) isolat menghasilkan asam propionat dengan kadar tertinggi 2,63 mg/l; 49,4%(36) isolat menghasilkan asam butirat dengan kadar tertinggi 0,55 mg/l dan 83,7% (62) isolat menghasilkan asam laktat dengan kadar tertinggi 103mg/l, seperti pada tabel 2 di atas. Dari data tersebut jenis asam organik yang paling dominan dihasilkan yaitu asam laktat. Isolat yang memberikan kontribusi besar terhadap kemasaman tepung sagu basah ada tiga isolat, penentuan ini didasarkan atas kelengkapan jenis asam organik yang dihasilkan dan kadar asam laktat yang dihasilkan diatas 50 mg/l. (tabel 3) berikut ini.

Tabel 3. Jenis dan kadar asam organik yang dihasilkan isolat bakteri amilolitik

No	Isolat	Rasio Amilolitik	Kadar asam organik (mg/l)			
			Asetat	Propionat	Butirat	Laktat
1	TG 12	3,68	0,547	2,627	0,547	103,453
2	TG 19	2,89	0,140	1,444	0,190	93,359
3	TG 31	1,95	0,016	0,431	0,045	79,341
4	*B. amyloliquefaciens* IFO 14141	2,62	0,000	0,086	0,000	1,840

Berdasarkan data tersebut, kemasaman tepung sagu basah hasil penyediaan secara tradisional disebabkan oleh adanya kegiatan fermentasi yang dilakukan oleh bakteri amilolitik dengan produk dominan asam laktat, meskipun asam laktat yang terbentuk kadarnya tinggi tetapi bau asam yang menyengat pada tepung sagu dikarenakan oleh adanya asam butirat yang memang memiliki sifat bau asam yang menyengat dan tahan lama meskipun dalam jumlah kecil (Wikipedia). Terbentuknya asam organik menyebabkan perubahan bau pada tepung sagu basah menjadi masam dialam dapat terjadi secara spontan. (Brauman *et al*., 1996). Kondisi lingkungan dari produk selama proses penyediaan, pH lingkungan rendah dan kadar air masih tinggi ,sehingga memungkinkan terjadinya proses fermentasi oleh berbagai jenis bakteri (Gram *et.al*., 2002). Pengukuran pH pada saat sampling disekitar tempat penyediaan tepung sagu basah secara tradisional baik di daerah Maribu maupun Jembatan Dua, pH tanah dan produk tepung sagu basah di pasar berkisar 4 – 5. Pada kondisi tersebut, fermentasi asam laktat dapat berlangsung secara alamiah oleh bakteri penghasil asam laktat (Greenhill, *et.al*.,2008). Pembentukan asam-asam organik diawali dengan hidrolisis amilum dengan bantuan ensim amilolitik yang dikeluarkan oleh bakteri amilolitik, hidrolisis akan menghasilkan sakarida, misalnya glukosa. Perubahan glukosa menjadi asam organik diawali dengan tahapan glikolisis dengan produk intermediat asam piruvat, selanjutnya dirubah menjadi asam-asam organik sesuai jalur metabolisme yang digunakannya (Caldwell, 1995). Adanya asam-asam organik pada tepung sagu basah menimbulkan perubahan bau dari bau netral menjadi asam. Tepung sagu basah yang telah mengandung asam-asam organik

dikatakan telah mengalami kemasaman.

KESIMPULAN

Isolasi bakteri penyebab kemasaman pada tepung sagu basah hasil penyediaan secara tradisional mendapatkan 133 isolat. Seleksi isolat berdasarkan kemampuan amilolitik, didapatkan 120 isolat bakteri amilolitik. Kemasaman tepung sagu basah disebabkan karena adanya asam organik (asetat, propionat, butirat dan laktat)dalam tepung sagu, hasil fermentasi bakteri amilolitik.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad, F.B., Williams, P.A., Doublier, J.L., Durand, S., and Buleon, A.,1999, Physico-Chemical Characterization of Sago Starch, *Carbohydrate Polymers* 38.pp 361-370.

Apun, K., Jong, B.C., and Salleh, M.A., 2000, Screening and Isolation of a Cellulotic and Amylolytic Bacillus from Sago Pith Waste, *J. Gen. Appl Microbiol*.,46, 263-267.

Atlas, R.M., Brown, A.E., Dobra, K.W., and Miller, L. 1984. *Experimental Microbiolgy Fundamentals and Application*, Macmillan Publishing Company, New York

Brauman, A., Keleke, S., Malonga, M., Miambi, E., and Ampe, F., 1996, Microbiological Chraracterization of Cassava Rotting, a Traditional Lactic Acid Fermentation for Foo-foo (cassava flour) Production. *Appl.Environ. Microbiol*. 62: 2854-2858.

Caldwell, R.D. 1995. *Microbial Physiology and Metabolism*, Wim.C. Brown Communication, Inc. USA.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., and Givskov, M., 2002, Food Spoilage- Interaction between Food Spoilage Bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 78 Issue 1-2, pp 79-97.

Greenhill, A.R., Shipton, W.A., Blaney, B.J., Brock, I.J., Kupz A., and Warner, J.M., 2008, Spontaneous Fermentation of Traditional Sago Starch in Papua New Guinea, *Food Microbiology*, Vol.26 Issue 2,pp 136-141.

Harry, W.S. Jr., Paul J. VD., 1981, *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology*, W.H. Freeman and Company, San Fransisco, USA.

Joe, H.J. Huis in't Veld, 1996, Microbial and Biochemical Spoilage of Foods: an Overview, *International Journal of Food Microbiology*, Vol.33 Issue 1, pp 1-18.

Lindquist, J. 2001, Differential Media: Starch Agar and the Amylase Test *hhtp://www.jlinquist.net/generalmicro/dfstarch.html.*

Pei-Lang, A.T., Mohamed, A.M.D., Karim, A.A., 2005, Sago Starch and Composition of Associated Components in Palms of Different Growth Stages, *Carbohydrate Polymers,* Vol.63, Issue 2,pp. 283-286.

Scott Raymond P.W. 1998, *Introduction to Analytical Gas Chromatography*, Marcel Dekker, Inc, New York.

Wikipedia, ensiklopedia networking.