

APLIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) UNTUK MENINGKATKAN KEAMANAN MIKROBIOLOGIS TERHADAP *Staphylococcus aureus* PADA PROSES OLAH MINIMAL BUAH APEL MALANG (*Malus sylvestris* Mill.)

Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) to Increase Microbiological Safety against Staphylococcus aureus in Minimally Processed Malang Apple (Malus sylvestris Mill.)

Anton Rahmadi

Post-harvest and Packaging Laboratory, Study Program of Agricultural Product Technology, Faculty of Agriculture, Mulawarman University, Jalan. Tanah Grogot Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75123

Received 28 March 2005 Accepted 11 May 2005

ABSTRACT

Minimally processed apple usually came from partially-broken apple with some parts are still in very good condition. Minimally processed fruits are perishable foods due to quality degradation caused by microorganism activity. Main purpose of this research was to study the application of LAB culture in minimally processed apple fruit of Malang in order to increase safety against *Staphylococcus aureus*. Malang apple was used in this research while age of ripe 4.5 months and weight of around 90-100 grams. Lactic acid bacteria used were *Lactobacillus brevis*, and three strains of *L. plantarum*. Steps of this research were selection of potential LAB strains using well diffusion method, determining LAB concentration and soaking time, study of minimally processed apple shelf life and total acid titration, pH and total LAB colonies (Total Plate Count) in MRS agar medium, as well as total *Staphylococcus aureus*. Best inhibition-zone of *S. aureus* was resulted from strain of *L. brevis* AE 1.6 (14.33mm). Optimum concentration to inhibit pathogenic bacteria is 10^6 cfu mL⁻¹ with 30 minutes of soaking. Pathogenic bacteria life colonies decreased for 1 to 2 of log unit following soaking in optimal LAB concentration. LAB application in minimally processed apple did succeeded to increase safety against pathogens specially *S. aureus*. Shelf life could be extended up to 12 days with *S. aureus* life colonies not more than 100 cfu g⁻¹.

Key words: lactic acid bacteria, LAB, Staphylococcus aureus Malang apple

PENDAHULUAN

Peningkatan permintaan konsumen terhadap kualitas pangan yang tinggi, segar, bergizi, dan mudah disiapkan menyebabkan peningkatan produksi pangan olah minimal (Durand, 1990). Apel merupakan produk olah minimal yang umum dijumpai di swalayan-swalayan di Indonesia. Potongan buah olah minimal merupakan bahan pangan yang dapat busuk dengan cepat dikarenakan mikroorganisme (Nguyen-the dan Carlin, 1994). Salah satu mikroorganisme yang berpengaruh terhadap kerusakan pangan olah minimal adalah *Staphylococcus aureus*, yang merupakan bakteri penyebab keracunan yang memproduksi enterotoksin. *S. aureus* merupakan patogen indikator sanitasi tangan pekerja, sehingga penting untuk mengetahui

keamanan mikrobiologis dari buah olah minimal.

Beberapa upaya menurunkan kontaminasi awal pada buah olah minimal adalah dengan menggunakan sanitiser seperti klorin (Nguyen-the dan Carlin, 1994). Namun, penggunaan klorin dalam pangan ataupun perlakuan air masih dipertanyakan, karena beberapa komponen pangan dapat bereaksi dengan klorin membentuk senyawa toksik yang potensial (Richardson, 1994).

Dalam industri pangan, bakteri asam laktat telah digunakan secara luas sebagai agen biokontrol untuk meningkatkan keamanan pangan olah minimal yang direfrigerasi tanpa penambahan asam. Peranan bakteri asam laktat adalah untuk memperbaiki cita rasa, tetapi bakteri asam laktat ini ternyata juga memiliki efek

pengawetan pada produk fermentasi yang dihasilkan. Bakteri asam laktat dapat memproduksi dan melakukan sekresi berupa senyawa penghambat selain asam laktat dan asam asetat, seperti hidrogen peroksida, bakteriosin, antibiotik, dan reuterin yang kurang dikenal atau belum terungkap kemampuannya sebagai senyawa penghambat.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui sifat penghambatan dan pengawetan bakteri asam laktat (BAL) seperti efek penghambatan BAL pada mikroflora yang terdapat dalam sayur siap olah (Vescovo *et al.*, 1995), dan penggunaan BAL untuk meningkatkan keamanan buah dan sayuran olah minimal (Breidt dan Fleming, 1995).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari aplikasi kultur bakteri asam laktat pada proses olah minimal buah apel malang dalam rangka meningkatkan keamanan dan umur simpan produk.

BAHAN DAN METODE

Apel malang varietas Manalagi diambil dari kebun apel di Batu, Malang dengan umur panen 4,5 bulan dan ukuran 10-12 buah per kg atau bobot sekitar 90-100 gram. Kultur bakteri asam laktat yang asalnya ditentukan dari penelitian pendahuluan dan *Staphylo-coccus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi IPB. Natrium hidroksida, phenolphtalein, etanol teknis, asam oksalat, kalium hidrogen fosfat, dan kalium dihidrogen fosfat diperoleh dari Sigma dan Merek. Medium yang digunakan adalah MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*), Nutrient Broth, dan VJA (*Vogel Johnson Agar*) diperoleh dari Difco. Alat yang digunakan terdiri dari blender, timbangan, autoclave, inkubator, penangas air, refrigerator, pH-meter, viskometer, refraktometer, alat pemotong dari *stainless steel*.

Seleksi kultur BAL potensial dengan metode difusi sumur (Schved *et al.*, 1993)

Bakteri asam laktat yang akan diaplikasikan pada buah apel olah minimal, sebelumnya diuji aktivitas antimikrobanya

terhadap bakteri uji *S. aureus* dengan menggunakan metode sumur.

Sebanyak 2-3 ose kultur BAL dari kultur stok masing-masing diinokulasikan ke dalam 10 mL MRS broth, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 hari. Sebanyak 4 % (v/v) kultur BAL tersebut lalu dipindahkan ke dalam media MRS modifikasi (MRS + susu skim), diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37 °C.

Satu ose bakteri uji diinokulasikan ke dalam 10 mL *nutrient broth* lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 hari. Sebanyak 25 µl bakteri uji diinokulasikan ke dalam 50 mL *nutrient agar*, dikocok merata kemudian dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 25 mL. Setelah agar mengeras, dibuat lubang sumur dengan diameter sekitar 7 mm menggunakan pipet tetes steril yang dipotong ujungnya.

Dari hasil di atas, sebanyak 50 µl kultur *L. brevis* yang diisolasi dari dadih dan *L. plantarum* dari kecap ikan, pikel, dan sauerkraut, masing-masing dispotkan ke dalam lubang sumur yang berbeda dalam satu cawan lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 hari. Pada setiap cawan, dibuat sebuah lubang sumur kontrol berisi 50 µl media MRS modifikasi. Jari-jari atau diameter areal bening di sekitar sumur diukur sebagai efek penghambatan BAL terhadap bakteri uji.

Penyiapan contoh buah

Buah apel disortasi berdasarkan bobot buah yaitu antara 90-100 g buah⁻¹. Buah dicuci dan dipotong delapan bagian berbentuk bulan sabit dengan bobot masing-masing antara 11-12,5 gram. Pemotongan buah menggunakan pisau *stainless steel* yang telah dicelupkan dalam larutan vitamin C 0,1 %. Selama proses penyiapan berlangsung, buah dicelupkan pada vitamin C 0,1 % untuk memperlambat pencoklatan. Pengukuran pH buah dilakukan pada 10 gram contoh yang dihancurkan dalam akuades 1 : 1 (b/v) menggunakan stomacher. Analisis total mikroorganisme dilakukan dengan metode penaburan (*plating*), menggunakan buah dengan berat 5 gram buah dan dihancurkan dalam akuades 1 : 9 (b/v).

Penentuan konsentrasi BAL dan waktu perendaman

Masing-masing buah yang telah dikupas direndam dalam larutan bakteri uji (10^5 cfu mL^{-1}), kemudian ditiriskan. Buah kemudian direndam dalam larutan kultur BAL potensial dengan kisaran konsentrasi 10^5 , 10^6 , dan 10^7 cfu mL^{-1} . Waktu kontak dipelajari selama 10, 20, 30 menit. Selanjutnya jumlah *S. aureus* dihitung menggunakan metode *plating*. Konsentrasi BAL terendah yang mampu mereduksi jumlah bakteri uji terbanyak, dipilih untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

Studi masa simpan buah olah minimal

Parameter organoleptik dan pertumbuhan *S. aureus* dipelajari pada masa simpan buah olah minimal yang telah diinokulasikan dengan BAL dan patogen pada suhu dingin (4-5 °C). Buah apel dipotong dengan ukuran bulan sabit sebanyak 8 bagian. Metode olah minimal yang diaplikasikan meliputi kontrol, ditambah BAL, BAL dikombinasikan dengan proses olah minimal lainnya yaitu penambahan garam 1 %. Selanjutnya buah ditempatkan dalam wadah *styrofoam* dan ditutup dengan plastik *wrap*, yang kemudian disimpan pada suhu refrigerator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Kultur Bakteri Asam Laktat

Aktivitas antimikroba BAL pada metode difusi sumur ditunjukkan dengan adanya area bening di sekitar sumur yang berisi isolate BAL pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Diameter zona penghambatan dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 di atas diperoleh data bahwa efek penghambatan jenis BAL berbeda-beda terhadap *S. aureus*. Pada penelitian sebelumnya, penghambatan *Lactobacillus plantarum* terhadap *S. aureus* hanya sebesar 4,0 mm (Jenie dan Rini, 1996). Terdapat perbedaan yang cukup besar pada penghambatan bakteri uji ini disebabkan penggunaan media pengujian yang berbeda, yaitu VJA pada penelitian terdahulu dan *nutrient agar* pada penelitian kali ini. Dilihat dari jenis BAL, *Lactobacillus*

brevis memiliki penghambatan yang lebih baik dibanding ketiga isolat *L. plantarum*.

Table 1. Inhibition diameter of LAB isolate against *S. aureus*.

Origin of isolate	Inhibition diameter against <i>S. aureus</i> (mm)
<i>Lactobacillus brevis</i> AE 1.6	14.35
<i>Lactobacillus plantarum</i> kik	12.57
<i>Lactobacillus plantarum</i> pi28a	13.05
<i>Lactobacillus plantarum</i> sa28k	12.52

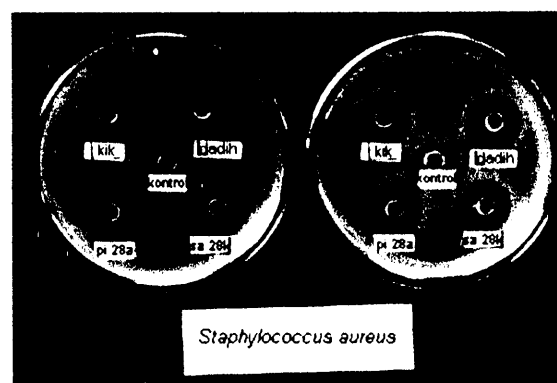


Figure 1. LAB Inhibition against *S. aureus*. Legend : *L. brevis* (dadih), *L. plantarum* kik (kik), *L. plantarum* sa28k (sa28k), *L. plantarum* pi28a (pi28a)

Perbedaan ini dikaitkan dengan sifat kedua spesies *Lactobacillus* yang berbeda dalam hal metabolisme glukosa. *L. plantarum* dikenal bersifat homofermentatif. Produk dari BAL yang bersifat heterofermentatif adalah asam asetat, asam laktat, CO_2 dan etanol dalam jumlah yang sangat besar, sedang BAL homofermentatif mengubah 95 % glukosa atau heksosa lain menjadi asam laktat dan sejumlah kecil CO_2 serta asam-asam volatil. Sebagian dari senyawa ini memperlihatkan aktivitas antagonistik terhadap banyak mikroorganisme perusak dan patogen makanan termasuk laktobasili dan leukonostok psikrofilik, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, dan lain-lain (Jenie, 1996).

S. aureus dapat dihambat baik oleh asam laktat maupun asam asetat yang diproduksi oleh *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis* var *diacetylactis* (Daly *et al.*, 1972). Akan tetapi Haines dan Harmon (1973) menemukan bahwa asam laktat menghambat pertumbuhan *S. aureus* hanya pada awal tetapi tidak pada akhir pertumbuhan. Spillman *et al.* (1978) menyimpulkan bahwa asam laktat bertanggung jawab untuk penghambatan *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. fluorescens*, dan *S. aureus* oleh *Lactobacillus* spp. yang disolasi dari yoghurt komersial.

Jadi penghambatan terbesar ini diduga berasal dari beragamnya komponen yang dihasilkan oleh *L. brevis*. Pada umumnya komponen antimikroba yang dihasilkan oleh BAL dapat menghambat bakteri Gram positif ataupun Gram negatif. *S. aureus* adalah contoh bakteri Gram positif. Menurut De Vuyst dan Vandamme (1994) sebagian besar bakteriosin dari bakteri Gram positif (BAL) memperlihatkan aktivitas terhadap berbagai spesies Gram positif dalam spektrum luas, sehingga kemungkinan penghambatan terhadap bakteri Gram positif ini juga disebabkan oleh bakteriosin. Bakteriosin yang telah dikarakterisasi pada *Lactobacillus brevis* adalah brevicin, sedangkan pada *L. plantarum* adalah plantaricin (Salminen dan von Wright, 1998).

Penentuan Konsentrasi BAL dan Waktu Perendaman Terhadap Pertumbuhan Patogen

Efektivitas penyerapan BAL tidak dipengaruhi oleh waktu perendaman dan konsentrasi BAL (Tabel 2.). Konsentrasi BAL terendah dengan waktu perendaman yang minimum memberikan efek reduksi terhadap patogen yang hampir sama dengan penggunaan konsentrasi BAL yang lebih tinggi dan waktu perendaman yang lebih lama.

Penggunaan medium susu skim menghasilkan jumlah BAL hingga konsentrasi 10^9 cfu mL⁻¹. Suspensi diencerkan hingga 10^8 , 10^7 dan 10^6 cfu mL⁻¹ dengan menambahkan larutan garam fisiologis. Kultur BAL yang diserap oleh buah apel berkurang sebesar 2 satuan log dari suspensi awal. Tekstur daging

buah apel manalagi yang relatif keras dan memiliki pori-pori yang lebih kecil dibandingkan buah-buahan lain seperti nanas, mangga dan sejenisnya diduga merupakan faktor utama dalam menurunnya konsentrasi BAL dalam daging buah tersebut.

Table 2. LAB life colonies absorption after soaking

Application	Total bacteria
Suspension (cfu mL ⁻¹)	
10 ⁷	1.4 x 10 ⁷
10 ⁸	1.8 x 10 ⁸
10 ⁹	1.2 x 10 ⁹
Absorbed in fruit (cfu g ⁻¹)	
10 ⁷ , 10 minutes	2.3 x 10 ⁵
20 minutes	2.6 x 10 ⁵
30 minutes	3.8 x 10 ⁵
10 ⁸ , 10 minutes	3.9 x 10 ⁶
20 minutes	6.0 x 10 ⁶
30 minutes	5.2 x 10 ⁶
10 ⁹ , 10 minutes	4.8 x 10 ⁷
20 minutes	1.5 x 10 ⁸
30 minutes	3.2 x 10 ⁷

Dari hasil penelitian terhadap penyerapan patogen, *S. aureus* berkurang sebesar 1 satuan log. Aplikasi garam pada pencegahan pencoklatan buah di awal perlakuan memberikan lapisan garam pada permukaan jaringan yang terbuka, sehingga bakteri patogen yang diserap oleh permukaan jaringan apel terlebih dahulu harus menembus lapisan tipis garam. Akan tetapi, *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang tahan terhadap garam, sehingga penurunan jumlah bakterinya hanya 1 satuan log.

Tabel 3. Pathogenic life colonies absorption after soaking

Application	Total <i>S. aureus</i> (cfu g ⁻¹)
Suspension	5.0 x 10 ⁴
Absorbed in fruit	1.3 x 10 ³

Reduksi Patogen

Setelah diaplikasikan pada buah, penurunan jumlah *S. aureus* terbesar didapat pada perlakuan konsentrasi BAL 10^7 cfu mL⁻¹ dengan waktu perendaman 30 menit, yakni sekitar 1 satuan log. Penurunan terbesar lainnya terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi 10^8 cfu mL⁻¹ dengan waktu perendaman 30 menit dan dengan konsentrasi 10^8 cfu mL⁻¹ dengan waktu perendaman 10 menit. Konsentrasi terendah yang masih memiliki efek penghambatan adalah pada 10^6 cfu mL⁻¹, 30 menit, dengan penurunan jumlah patogen mendekati 1 satuan log. Konsentrasi ini dipilih menjadi konsentrasi optimum yang digunakan dalam aplikasi BAL pada apel. Perlakuan dengan konsentrasi sangat tinggi secara ekonomis kurang menguntungkan dan menimbulkan perubahan rasa buah apel.

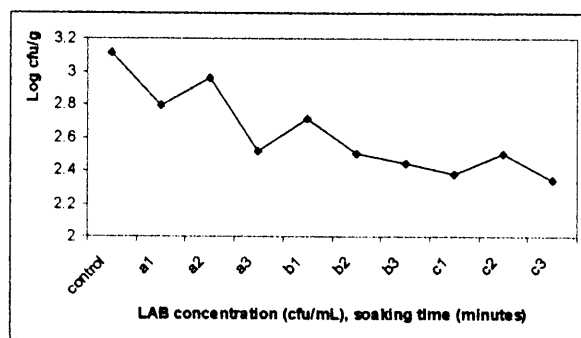


Figure 2. Effect of LAB concentration and soaking time against total *S. aureus* in minimally processed apple. LAB concentration a = 10^6 cfu mL⁻¹, b = 10^7 cfu mL⁻¹, c = 10^8 cfu mL⁻¹, soaking time 1 = 10 minutes, 2 = 20 minutes, 3 = 30 minutes

Studi Masa Simpan Buah Apel Olah Minimal

Departemen Pertanian Amerika Serikat, USDA, menentukan mutu buah apel dengan parameter antara lain buah harus halus mulus, bersih, bebas busuk dan rusak fisiologis, tingkat kematangan buah cukup diukur dengan

aroma (flavor), karakteristik warna dan bentuk harus tetap pada kondisi penyimpanan yang berbeda (Ryall dan Potzer, 1982). Pengamatan masa simpan buah apel secara mikrobiologis terdiri dari banyaknya koloni BAL yang tumbuh pada hari ke-0 dan jumlah reduksi patogen *S. aureus* pada setiap dua hari pengamatan hingga hari ke-12. Sumber kontaminasi *S. aureus* adalah kontak dengan tubuh pekerja. Parameter lainnya adalah pH yang digunakan untuk mengetahui tingkat keasaman buah apel pada setiap hari pengamatan. Terlihat pada Gambar 3, bahwa perbedaan pH akibat aplikasi BAL dengan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang berarti (taraf signifikan, $P < 0,01$).

Dari 12 hari pengamatan yang dilakukan, diketahui bakteri patogen *S. aureus* memiliki pola pertumbuhan sedikit kemudian terus meningkat baik secara linier ataupun logaritmik sejalan dengan lama waktu penyimpanan, sehingga pada suatu ketika mencapai angka 100 cfu mL⁻¹ ($\log=2$) yang merupakan ambang batas penerimaan patogen ini. Kontrol menunjukkan, pada hari ke 8 (H-8), buah sudah tidak layak lagi di konsumsi, sedangkan dengan penambahan bakteri asam laktat, aktivitas pertumbuhan *S. aureus* pada buah apel mampu ditekan tidak lebih dari 2 satuan log. Gambar 4. menunjukkan hasil pertumbuhan *S. aureus* selama penyimpanan pada suhu dingin.

KESIMPULAN

Jenis BAL hasil seleksi terbaik adalah *Lactobacillus brevis* yang mampu untuk meningkatkan keamanan dan memperpanjang umur simpan buah apel yang diolah minimal. Diameter penghambatan menggunakan metode sumur untuk BAL ini adalah 14,35 mm terhadap bakteri patogen *S. aureus*. BAL mampu menurunkan pertumbuhan *S. aureus* sebanyak 1 skala log. Pada studi penyimpanan, sampai dengan 12 hari di suhu rendah, jumlah *S. aureus* yang diamati tidak melebihi 100 cfu g⁻¹ apel, sehingga secara mikrobiologis masih layak dikonsumsi.

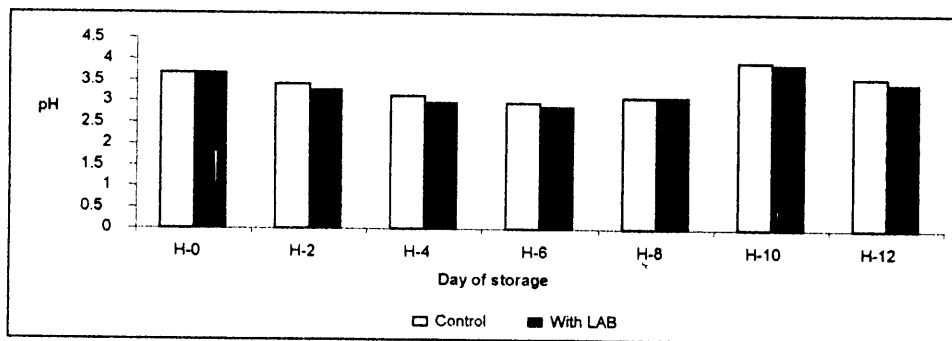


Figure 3. pH Characteristic of minimally processed apple stored in refrigerator.

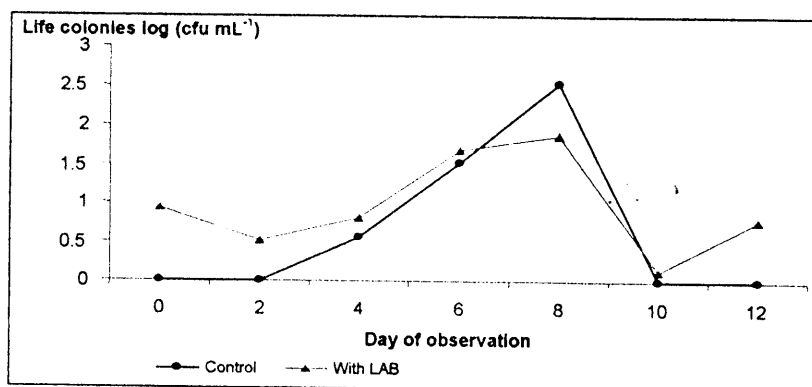


Figure 4. Growth of *S. aureus* in minimally processed apple stored in cold place with and without LAB.

DAFTAR PUSTAKA

- Breidt, Flemming HP (1995) Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *J Food Technol* Vol 51(9): 44-51.
- Daly C, Sandine WE, Elliker PR (1972) Interactions of food starter cultures and food borne pathogens. *J Milk Food Technol* 35: 349-357.
- De Vuyst L, Vandamme EJ (1994) Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. *Dalam* De Vuyst L, Vandamme EJ (eds) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.
- Durand B (1990) Les achats des menageres de produits de 4e gamme. *Infos-CTIFL* 65: 42-45. *Dalam* Chervin C, Boisseau P (1996). *J Food Sci.* 58: 399-402.
- Jenie BSL, Suliantari, Nurwitri A (2000) Pengembangan Produk Makanan Tradisional Rendah Garam Berbasis Ikan Melalui Aplikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 1999/2000. Fateta-IPB, Bogor
- Jenie BSL, Shinta Eka Rini (1996) Aktivitas anti Mikroorganisme dari beberapa species *Lactobacillus* terhadap Mikroorganisme Patogen dan Perusak Makanan. *Dalam* Jenie BSL (1996) Penerapan Bioteknologi Asam Laktat pada Pengawetan Ikan Rucah. Laporan Penelitian Tahun II/RUT II. Fateta-IPB, Bogor.
- Jenie BSL (1996) Peranan bakteri asam laktat sebagai pengawet hayati

- makanan. J Ilmu dan Teknologi Pangan 1(2): 60-73.
- Haines WC, Harmon LG (1973) Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. J Appl Microbiol 25: 436-444.
- Nguyen-the C, Carlin F (1994) The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit Rev Food Sci Nutr 34: 371-401.
- Richardson SD (1994) Scoping the chemicals in your drink water. Today's Chemist at work 3(3): 29-32.
- Ryall AL, Potzer WT (1982) Handling Transportations and Storage of Fruit and Vegetables. The AVI Production Co Ltd, Connecticut.
- Salminen S, von Wright A (1998) Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Edisi ke-2. Marcell Dekker Inc, New York.
- Schved F, Lalazar A, Henis Y, Juven B J (1993) Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediosin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Appl Microbiol 74: 67-77.
- Spillman H, Puhán Z, Banhagyi M (1978) Antimikrobielle aktivitaet thermophiler lactobazillen. Milchwissenschaft 33: 148-153.
- Vescovo M, Orsi C, Scolari G, Torriani S (1995) Inhibitory effect of selected acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. J Appl Microbiol 21: 121-125.