

ARTIKEL

## SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL FERMENTASI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK TERNAK

[*Screening of Lactic Acid Bacteria from the Fermentation of Empty Fruit Bunches (TKKS) as Probiotic Candidates for Animal Feed*]

Febbi Julia Nandi, Henny Helmi\*, Rahmad Lingga

Universitas Bangka Belitung, Jl Kampua Terpadu Balunujuk, Kecamatan Merawang, Bangka Belitung

### ABSTRAK

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah bahan organik hasil samping agroindustri *Crude Palm Oil* (CPO). Biomassa TKKS sampai saat ini belum dikelola dengan baik sehingga membentuk timbunan. Kandungan selulosa dan hemiselulosa TTKS cukup tinggi sehingga berpotensi sebagai sumber gula yang dapat digunakan dalam pertumbuhan bakteri asam laktat. Upaya penanggulangan masalah tersebut dapat dilakukan dengan memanfaatkan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang terdapat pada TKKS yang difermentasi sebagai kandidat probiotik dalam pakan ternak. Tujuan penelitian ini untuk mengkarakterisasi potensi probiotik BAL yang diisolasi dari TTKS yang difermentasi. Metode penelitian dilakukan secara eksperimental dengan empat tahap yaitu isolasi, karakterisasi, uji konfirmasi, dan uji probiotik. Hasil isolasi menunjukkan 9 isolat yang berpotensi sebagai probiotik yaitu TKS B2, TKS B3, TKS C3, TKS C3, TKS C6, TKS C7, TKS C9, TKS C11, TKS D5, dan TKS D6. Kesembilan isolat tersebut berpotensi sebagai bakteri probiotik karena jumlah koloni BAL dalam media memenuhi standar yang berlaku ( $10^7$ - $10^9$  CFU/ml), tahan terhadap kondisi asam, dan tidak bersifat patogen. Isolat yang mempunyai kinerja terbaik sebagai kandidat bakteri probiotik adalah TKS C9 dan TKS C11. Identifikasi sembilan isolat bakteri fermentasi dari tandan buah kosong termasuk dalam genus *Lactobacillus*.

**Kata kunci:** Tandan kosong kelapa sawit, bakteri asam laktat, probiotik

## ABSTRACT

Empty oil palm bunches (TKKS) are waste organic material from Crude Palm Oil (CPO) agroindustry. TKKS's biomass have not been managed well, thus forming piles. The cellulose and hemicellulose content of TKKS is quite high abundant, which has the potential sugar source that can be used in the growth of lactic acid bacteria. An alternative to overcome this problem by using the Lactic Acid Bacteria (LAB) which are found in fermented empty oil palm bunches as a probiotic candidate for animal feed. This research aims to characterize, potential probiotic lactic acid bacteria which are isolated from fermented empty oil palm bunches. The experimental study was conducted in four stages, namely isolation, characterization, confirmation test, and probiotic potential test. The results indicate that there were 9 isolates with potential as probiotics, namely TKS B2, TKS B3, TKS C3, TKS C3, TKS C6, TKS C7, TKS C9, TKS C11, TKS D5, and TKS D6. The nine isolates are potential as probiotic bacteria because the number of LAB colonies levels in a medium meets the applicable standards ( $10^7$ - $10^9$  CFU/ml), survived acidic conditions, and are not pathogenic. The isolates that performed the best as candidate probiotic bacteria were TKS C9 and TKS C11. Identification results of the nine isolated fermentation bacteria from empty fruit bunches showed all of the isolates belonging to the genus *Lactobacillus*.

**Keywords:** Empty fruit bunches, lactic acid bacteria, probiotics

## PENDAHULUAN

Pemerintah Indonesia telah didorong untuk membangun lebih banyak area perkebunan kelapa sawit karena prospek yang cerah untuk komoditi ini dalam perdagangan minyak nabati secara global (Kemenperin, 2020). Luas lahan perkebunan kelapa sawit di Provinsi Kepulauan Bangka Belitung terus meningkat. Menurut (Firmandika *et al.*, 2023) Provinsi Kepulauan Bangka Belitung pada tahun 2021 memiliki luas perkebunan kelapa Sawit mencapai 79.456,98 hektare dengan total produksi sebesar 179.618,66 ton dan pada tahun 2022 memiliki luas perkebunan kelapa sawit mencapai 80.531,33 hektare dengan total produksi sebesar 183.791,12 ton. Pertambahan dan peningkatan areal perkebunan kelapa sawit diiringi dengan bertambahnya jumlah industri produksi yang dihasilkan dari pabrik kelapa sawit sehingga menyebabkan jumlah limbah semakin meningkat. Umumnya limbah industri perkebunan kelapa sawit berdampak pada pencemaran lingkungan karena mengandung bahan organik yang tinggi (Haryanti *et al.*, 2014; Azzahro *et al.*, 2022)

Limbah kelapa sawit merupakan sisa – sisa hasil dari tanaman kelapa sawit yang tidak termasuk ke dalam produk utama dalam proses pengolahan kelapa sawit baik berupa limbah padatan, dan limbah cair. Limbah cair adalah limbah yang dihasilkan dari pencucian buah atau peralatan yang digunakan pada saat memproduksi minyak kelapa sawit yang disebut sebagai POME (*Palm oil mills effluent*), sedangkan limbah padatan berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS), abu boiler, solid *decanter*, cangkang, fiber, sampah *loading ramp*, dan *shell* (Rahayu, 2021). Biomassa TKKS merupakan bahan organik yang belum dimanfaatkan secara optimal di perkebunan kelapa sawit sehingga membenuk tumpukan yang sangat besar. Permasalahan dari limbah sawit ini memiliki kadar air yang tinggi pada bahan sehingga akan mudah terjadinya pembusukan. Dengan adanya hal ini akan meningkatkan pencemaran lingkungan di sekitar area pengolahan, maka perlu dilakukan pengolahan dan pemanfaatan limbah tandan kosong kelapa sawit (Trisakti *et al.*, 2018).

Limbah TTKS mempunyai kandungan komponen terbesar yaitu lignoselulosa, di mana persentase selulosa mencapai 33,25% – 45,95%, sehingga sangat sulit terdegradasi disebabkan karena terbentuknya kristal dan tidak larut dalam air (Dewanti, 2018; Agustinur & Yusrizal, 2021). Kandungan selulosa dan hemiselulosa ini cukup tinggi di TTKS, maka TTKS berpotensi sebagai sumber gula/karbohidrat yang dapat dikonversikan menjadi asam laktat. Selulosa adalah polimer glukosa memiliki ikatan  $\beta$ -1,4 glukosida dalam rantai lurus, apabila selulosa terjadi hidrolisis maka ikatan  $\beta$ -1,4 akan lepas yang akan menghasilkan glukosa (Lehninger, 1982). Perubahan glukosa menjadi asam piruvat dikenal sebagai glikolisis. Satu molekul glukosa terpecah menjadi dua molekul asam piruvat, menghasilkan dua molekul ATP secara glikolisis. Selanjutnya, glukosa dioksidasi menjadi dua asam piruvat, yang kemudian diubah menjadi dua molekul asam laktat (Muchtadi, 2009). Asam laktat dapat dihasilkan melalui proses fermentasi atau secara kimiawi. Salah satu bakteri yang dapat memfermentasi glukosa yaitu Bakteri Asam Laktat (BAL) (Rahmayetty *et al.*, 2015).

Secara umum, BAL merupakan kelompok organisme Gram positif, tidak membentuk spora, bersel tunggal, berbentuk *coccus* atau *bacillus*, umumnya tidak motil, katalase negatif, oksidase positif, dan mampu memproduksi asam laktat sebagai hasil metabolisme selnya (Pratiwi *et al.*, 2017; Nurcahyo *et al.*, 2017). Potensi BAL cukup besar sebagai probiotik, karena mempunyai karakteristik yang aman dan telah ditetapkan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Priadi *et al.*, 2020; Fijan, 2014). Probiotik adalah istilah yang merujuk kepada mikroorganisme memberikan manfaat yang baik terhadap manusia dan hewan (Plaza-Diaz *et al.*, 2019). Peran BAL dalam pengolahan secara biologis sebagai probiotik cukup penting dalam kehidupan ternak dan manusia, baik melalui keterlibatannya dalam fermentasi makanan maupun kemampuannya untuk tumbuh pada saluran usus. Fermentasi BAL dapat meningkatkan aroma pakan, meningkatkan mutu pakan dan akan menambah nafsu makan ternak (Urnemi, 2012).

Penelitian skrining BAL asal fermentasi TTKS sebagai kandidat probiotik bagi pakan ternak belum banyak dilakukan. Umumnya BAL dapat diisolasi dari berbagai sumber terutama dari hasil fermentasi, salah satunya dari fermentasi nektar kelapa yang berpotensi untuk digunakan sebagai probiotik dalam formulasi makanan dan pakan. Terdapat tujuh isolat bakteri asam laktat berupa *Lactobacillus brevis*, dua isolat *Enterococcus durans*, *Leuconostoc lactis*, dua isolat *Enterococcus lactis*, dan *Enterococcus faecium*. Ketujuh isolat bakteri asam laktat tersebut menunjukkan resistensi terhadap kondisi gastrointestinal dan aktivitas antimikroba yang baik (Somashekaraiyah *et al.*, 2019). Mengingat BAL berpotensi sebagai agen probiotik dan kurangnya pemanfaatan limbah padatan kelapa sawit maka perlu dilakukan penelitian ini untuk mendapatkan isolat dan mengidentifikasi BAL yang terdapat di fermentasi TTKS yang bisa dikembangkan sebagai kandidat probiotik untuk pakan ternak.

## **BAHAN DAN CARA KERJA**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunsen, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pendingin (Panasonic), mikropipet 1000  $\mu\text{L}$  (*Eppendorf*), mikroskop (*Olympus*), autoklaf (Hirayama), cawan petri, *colony counter*, ose bulat, ose lurus, pH indikator, sentrifus, buret, statif, raktabung, pipet tetes, batang pengaduk kaca, batang segitiga, tabung reaksi (*Iwaki*), timbangan analitik (Ohaus®), dan vortex (Thermo). Adapun bahan yang digunakan yaitu Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS), alkohol 70%,  $\text{CaCO}_3$  1%, NaCl fisiologis 0,85%, media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), kristal violet, aquades, alkohol 95%, safranin, spritus, tisu, minyak imersi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), media *Nutrien Agar* (NA), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media cair MR-VP, media *Blood Agar*, media *Methyl-red*, biakan bakteri *Escherichia coli*, dan biakan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### **Pengambilan dan Preparasi Sampel**

Pengambilan sampel diambil setelah TTKS dihaluskan menggunakan mesin *Bundh pres* sebelum dibawa ke *Incenerator* untuk dibakar. Tandan kosong kelapa sawit yang telah diambil dimasukkan ke dalam *ice box* dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan fermentasi secara alami. Fermentasi TTKS dilakukan dengan metode *Solid State Fermentation* (SSF). Fermentasi TTKS dilakukan selama 4 minggu dan dilakukan pengukuran pH, dan suhu selama hari ke-0, 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu.

## **Isolasi dan Purifikasi BAL**

Isolasi BAL menggunakan modifikasi dari metode penelitian Putri *et al.*, (2014) dan Kurnia *et al.*, (2020). Tahap pertama, TTKS difermentasi secara spontan dengan metode SSF dengan cara 100gram TKKS dimasukkan ke dalam wadah toples dan ditambahkan 150 mL akuades steril. Sebanyak 1gram TKKS yang telah difermentasi pada hari ke-0, 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu dihaluskan menggunakan mortar. Isolasi dilakukan dari pengenceran  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , dan  $10^{-8}$  diinokulasikan pada media MRSA yang ditambah  $\text{CaCO}_3$  1% dilakukan metode *pour plate* secara duplo. Tahap berikutnya isolat yang menghasilkan zona bening kemudian dilakukan pemurnian ke media MRSA dengan metode empat kuadran untuk memperoleh koloni tunggal.

## **Karakterisasi BAL**

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis meliputi bentuk koloni bakteri, warna koloni, tepi koloni, dan *elevasi* koloni, sedangkan secara mikroskopis diamati bentuk sel, dan susunan sel. Karakterisasi sel yang dilakukan yaitu pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan uji biokimia (uji katalase, uji motilitas, uji TSIA, uji *Methyl red*, dan uji oksidase).

## **Uji Antimikroba**

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menyetarakan bakteri uji dengan standar McFarland 0,5. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode sumuran. Suspensi bakteri asam laktat berusia 48 jam yang dikultur pada media MRSB ditambahkan dengan 20  $\mu\text{l}$  pada masing – masing sumuran. Dilakukan pengamatan dan diukur daerah hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong, untuk menentukan aktivitas antimikroba BAL terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Rasyid *et al.*, 2021).

## **Uji Resistensi BAL Terhadap Antibiotik**

Uji antibiotik dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan teknik *pour plate*. Konsentrasi standar antibiotik tetraskilin dan kloramfenikol 30 mg dan ampisilin adalah 10 mg. Aktivitas zona hambat di sekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong (Pundir *et al.*, 2013)

## **Uji Fisologi**

Pengujian fisiologis yang dilakukan pada isolat bakteri yaitu uji ketahanan suhu dan uji ketahanan pH. Uji ketahanan suhu dilakukan pada suhu  $15^\circ\text{C}$ ,  $27^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , dan  $45^\circ\text{C}$  selama 48 jam sedangkan uji ketahanan pH dilakukan pada pH 2, 3, dan 4. Hasil positif ditandai dengan perubahan medium menjadi keruh dan hasil negatif jika tidak terjadi pertumbuhan mikroba pada medium (Giyatno & Retnaningrum, 2020).

## **Uji Hemolisis**

Isolat BAL diinokulasi ke dalam media *blood* agar. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Jika tidak terdapat zona bening disekitar koloni menunjukkan bakteri tidak bersifat patogen (Manu *et al.*, 2019).

## **Uji Probiotik**

Uji potensi prebiotik dilakukan menggunakan dua media berbeda yaitu media MRSB dan media MRSB+TKKS. Biakan BAL diambil 2 ose lalu diinokulasikan pada 65 ml MRSB dan media MRSB+TKKS dengan takaran MRSB sebanyak 65 ml dan TKKS sebanyak 6 gram. Biakan bakteri dari media MRSB dan media MRSB+TKKS masing-masing dilakukan dengan dua uji, yaitu perhitungan populasi BAL dan kadar asam laktat.

### Populasi BAL

Populasi BAL dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Tingkat pengenceran yang digunakan adalah  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$  dan diinokulasi dengan metode *pour plate* menggunakan media MRSA secara duplo diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

### Total asam laktat

Sebanyak 5 ml hasil inokulum pada media MRSB dimasukan ke dalam sentrifuge dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan 10 ml aquades steril, ditambahkan 2-3 tetes *Fenolftalein* (indikator pp) dan dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berubah menjadi warna merah muda (Kurnia *et al.*, 2020). Adapun rumus yang digunakan dengan mengalikan hasil dengan berat molekul asam laktat seperti terlihat dibawah ini:

$$\% \text{ Asam} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times \left(\frac{90}{1000}\right)}{\text{Volume Sampel}} \times \text{fp} \times 100\%$$

Keterangan:

90=berat equivalen asam laktat

fp=faktor pengenceran

N NaOH= normalitas NaOH (0,1 N)

### Uji Adhesi

Uji adhesi dilakukan menggunakan lempeng *stainless steel* (SS) dengan ukuran 3x3 ke dalam Erlenmeyer yang berisi kultur isolat bakteri BAL, kemudian di *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Setelah waktu inkubasi lempeng SS diulas (*swab*) secara aseptis dan merata. Hasil ulasan dilakukan pengenceran sampai  $10^{-7}$ , tingkat pengenceran yang digunakan yaitu  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$ . Inokulasi dilakukan dengan metode *pour plate* menggunakan media MRSA dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Koloni bakteri asam laktat dihitung menggunakan TPC (Priadi *et al.*, 2020).

## HASIL

### Fermentasi Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Fermentasi TKKS dilakukan dengan metode SSF selama 4 minggu dan dilakukan pengujian pada air rendaman (pH dan suhu) dan total BAL yang bertujuan untuk memantau proses fermentasi dan perkembangan pertumbuhan bakteri selama proses fermentasi berlangsung (Tabel 1). Pengukuran pH pada minggu ke – 1 dan minggu ke – 2 mengalami penurunan dari minggu ke – 0 fermentasi yaitu senilai 5,04 dan 5,14 yang menandakan pH asam, namun pada minggu ke – 3 dan minggu ke – 4 terjadi kenaikan pH senilai 7,11 dan 7,61 yang menunjukkan pH basa. Jumlah populasi BAL semakin meningkat dari minggu ke – 0 sampai minggu ke – 4 yaitu senilai 0 – 7,09 Log CFU/mL.

**Table 1.** Pengukuran pH, kelembaban dan Jumlah Koloni BAL pada Fermentasi Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) (*The measurement of pH, moisture and total LAB colonies of fermented empty oil plam bunches*).

Waktu Fermentasi ( <i>The length of Fermentation</i> )	pH	Suhu ( <i>Temperature</i> )	Jumlah Koloni ( <i>The number of colony</i> ) (Log CFU/mL)
Minggu Ke – 0 ( <i>Week-0</i> )	7,9± 0,3	29°C ± 0,0	0±0
Minggu Ke – 1 ( <i>Week-1</i> )	5,04± 0,0	27°C ± 0,0	6,56±0,06
Minggu Ke – 2 ( <i>Week-2</i> )	5,14± 0,5	23°C± 0,6	6,76±0,01
Minggu Ke – 3 ( <i>Week-3</i> )	7,11± 0,4	21°C ± 0,6	7,02±0,03
Minggu Ke – 4 ( <i>Week-4</i> )	7,61± 0,0	20°C± 0,0	7,09±0,01

### Isolasi Dan Karakterisasi Koloni dan Sel Isolat BAL

Terdapat 23 isolat yang dapat diisolasi namun hanya 9 yang menunjukkan ciri-ciri BAL. Berdasarkan hasil isolasi terdapat 9 isolat (Tabel 2) mencirikan BAL dan berpotensi sebagai probiotik. Hasil karakterisasi 9 isolat secara makroskopis dan mikroskopis memiliki bentuk *circular*, memiliki margin *entire*, elevasi *convex*, berwarna putih kusam ataupun putih susu, Gram positif, tidak memiliki spora. Selain itu, bentuk sel yang ditemukan yaitu *bacil* dan *streptobasil*.

**Tabel 2.** Karakterisasi koloni dan sel isolat BAL (*Characterization of colony and cell isolates of LAB*).

Kode isolat ( <i>Isolate codes</i> )	Margin	Bentuk koloni ( <i>Colony morphology</i> )	Elevasi ( <i>Elevation</i> )	Warna ( <i>Colour</i> )	Bentuk sel ( <i>Cell morphology</i> )	Gram	Spora ( <i>Spore</i> )
TKS B2	Entire	Circular	Convex	Putih susu	Bacil	+	-
TKS B3	Entire	Circular	Convex	Putih susu	Bacil	+	-
TKS C3	Entire	Circular	Convex	Putih susu	Streptobacil	+	-
TKS C6	Entire	Circular	Convex	Putih susu	Bacil	+	-
TKS C7	Entire	Circular	Convex	Putih kusam	Bacil	+	-
TKS C9	Entire	Circular	Convex	Putih kusam	Bacil	+	-
TKS C11	Entire	Circular	Convex	Putih kusam	Streptobacil	+	-
TKS D5	Entire	Circular	Convex	Putih susu	Bacil	+	-
TKS D6	Entire	Circular	Convex	Putih kusam	Bacil	+	-

### Karakterisasi Biokimia Koloni Isolat BAL

Hasil uji biokimia sembilan isolat menunjukkan karakteristik BAL yang berkatalase negatif, *methyl-red* positif, tidak bersifat motil dan oksidase positif.

### Uji Antimikroba

Hasil uji antimikroba (Tabel 3) menunjukkan bahwa 6 isolat menghasilkan diameter zona hambat dengan kategori sedang (6-10 mm) dan 3 isolat menghasilkan diameter zona hambat dengan kategori kuat (11-20 mm) terhadap bakteri *S. aureus*. Semua isolat menghasilkan diameter zona hambat dengan kategori sedang (6-10 mm) terhadap bakteri *E. coli*. Isolat yang memiliki diameter zona hambat terbesar terhadap *S.aureus* dan *E.coli* yaitu isolat TKS C7, TKS C9, dan TKS C11.

**Tabel 3.** Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (The results of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*).

Kode Isolat (Isolate codes)	Diameter Zona Bening (mm) Terhadap Bakteri (Inhibition zone diameter against Bacteria)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	X ± SD	Ket (Notes)	X ± SD	Ket (Notes)
Kontrol negatif (Negative control)	-		-	
TKS B2	7,27 ± 0,52	S	7,43 ± 0,6	S
TKS B3	7,65 ± 0,33	S	7,78 ± 0,1	S
TKS C3	7,63 ± 0,49	S	7,17 ± 0,18	S
TKS C6	6,77 ± 0,66	S	7,08 ± 0,28	S
TKS C7	12,9 ± 0,21	K	10,7 ± 0,19	S
TKS C9	12,2 ± 0,69	K	8,65 ± 0,43	S
TKS C11	12,1 ± 0,1	K	8,54 ± 0,3	S
TKS D5	8,26 ± 0,65	S	6,82 ± 0,56	S
TKS D6	10,6 ± 0,21	S	8,21 ± 0,13	S

Keterangan: X (Rata – rata/average), SD (Standar Deviasi/deviation standard), S (Sedang/intermediate), K (Kuat), dan (-) (Tidak ada hambatan)

#### Uji Resistensi BAL Terhadap Antibiotik

Tabel 4 menunjukkan bahwa isolat yang memiliki zona hambat dengan kategori sensitif terhadap ampisilin ( $\geq 17$  mm) yaitu isolat TKS B3, TKS C7, TKS D5, dan TKS D6. Isolat yang mempunyai zona hambat dengan kategori sensitif terhadap tetrasiklin ( $\geq 15$  mm) yaitu isolat TKS D6. Semua isolat tidak ada yang mempunyai zona hambat dengan kategori sensitif terhadap kloramfenikol ( $\geq 19$  mm).

**Tabel 4.** Hasil Uji Antibakteri Terhadap Antibiotik (The results antibacterial activity against antibiotic).

Kode Isolat (Isolate codes)	Diameter Zona Bening (mm) Terhadap Antibiotik (Inhibition zone against antibiotic)					
	Ampisilin (Ampicillin)		Tetrasiklin (Tetracycline)		Kloramfenikol (Chloramphenicol)	
	X ± SD	Ket (Notes)	X ± SD	Ket (Notes)	X ± SD	Ket (Notes)
Kontrol negative (Negative control)	-		-		-	
TKS B2	4,29 ± 0,33	R	0±0	R	0±0	R
TKS B3	22,8 ± 0,86	S	0±0	R	0±0	R
TKS C3	0±0	R	3,53 ± 0,2b	R	0±0	R
TKS C6	14,6 ± 0,21	I	5,12 ± 0,651	R	0±0	R
TKS C7	26,1 ± 0,18	S	4,25± 0,73	R	2,84 ± 0,01	R
TKS C9	0±0	R	3,75 ± 0,15	R	0±0	R
TKS C11	0±0	R	2,9 ± 0,26	R	0±0	R
TKS D5	24,4 ± 0,39	S	0±0	R	0±0	R
TKS D6	18,9 ± 0,77	S	23,2 ± 0,08	S	5,51 ± 0, 47	R

Keterangan : X (Rata – rata/average), SD (Standar Deviasi/deviation standard), R (Resisten/resistance), I (Intermediate) dan S (Sensitif/sensitive). R=0-6mm, I=7-16mm, S=<17mm.

### Uji Fisologi

Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa kesembilan isolat mampu tumbuh pada suhu 15°C, 27°C, 37°C, dan 45°C. Selain itu, berdasarkan hasil uji terhadap ketahanan pH rendah dengan 3 perlakuan yang berbeda yaitu pH 2, 3, dan 4 menunjukkan bahwa ke 9 isolat mampu bertahan pada pH rendah yang ditandai dengan adanya perubahan warna media yang lebih keruh dan adanya endapan pada permukaan bawah tabung reaksi sehingga dapat dikatakan isolat BAL bersifat mesofil dan termofilik.

### Uji Hemolisis

Berdasarkan hasil uji hemolisis pada media *blood agar* terlihat tidak munculnya zona hemolisis di sekeliling koloni sehingga kesembilan isolat bakteri tersebut bersifat gama (non patogen).

### Uji Potensi Probiotik

Berdasarkan hasil pengamatan nilai TPC (Tabel 4) didapatkan populasi BAL pada media MRSB lebih sedikit dibandingkan populasi BAL pada media MRSB+TKKS. Jumlah koloni BAL yang terkandung di media MRSB+TKKS yaitu sebanyak 7,04 – 9,41 Log CFU/mL, sedangkan jumlah koloni BAL yang terkandung di media MRSB adalah sebanyak 7,08 – 8,83 Log CFU/mL. Perhitungan persentase kadar asam laktat dilakukan dengan menghitung kadar asam laktat dengan titrasi. Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa persentase kadar asam laktat tertinggi terletak pada media MRSB yaitu pada isolat TKS C11, sedangkan persentase kadar asam laktat terendah yaitu pada isolat TKS C7.

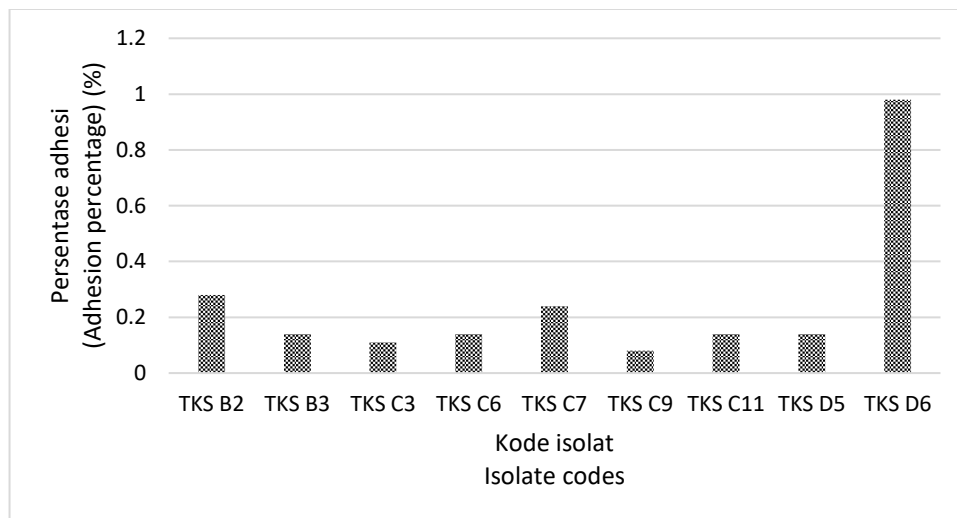
**Tabel 5.** Populasi BAL, Kadar asam laktat dan pH setelah inkubasi 48 jam (*BAL population, Lactic acid levels and pH after 48 hours of incubation*).

Kode Isolat	Jumlah Koloni (Number of Colonies) (Log CFU/ml)		Kadar Asam Laktat (Lactic acid level) (%)		Nilai pH Setelah Inkubasi (pH Value After Incubation)	
	Media MRSB	Media MRSB+TKKS	Media MRSB	Media MRSB+TKKS	Media MRSB	Media MRSB+TKKS
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
TKS B2	7,08 ±0,1	7,04±0,1	2,16±0,09	1,94 ± 0	5,61±0	5,70±0
TKS B3	8,0±0,1	8,40±0	2,31±0,05	2,01 ± 0,03	3,79±0	3,80±0
TKS C3	8,26±0	8,94±0,05	2,04±0,05	0,56 ± 0,05	3,68±0	3,72±0,1
TKS C6	8,81±0,1	8,84±0,05	0,75±0,05	2,03 ± 0	3,83±0	3,94±0
TKS C7	8,04±0	9,04±0	0,54 ± 0	1,85 ± 0,05	3,74±0,1	3,76±0
TKS C9	8,28±0	8,70±0	2,49± 0	1,81 ± 0,08	3,74±0,1	3,75±0,1
TKS C11	8,71±0,05	8,04±0,08	2,73±0,05	2,11 ± 0	3,81±0,1	3,83±0,1
TKS D5	8,34±0,05	8,92±0,05	2,25±0	1,89 ± 0	3,54±0	3,60±0
TKS D6	8,83±0,05	9,41±0	2,43±0,09	1,94 ± 0	3,78±0	3,80±0

Keterangan: X (Rata – rata), SD (Standar Deviasi) (*Remarks: X (Average), SD (Standard Deviation)*)

## Uji Adhesi

Hasil uji adhesi diperoleh bakteri asam laktat dari 9 isolat dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Persentase uji adhesi kesembilan isolat BAL (*The percentage of adhesion of LAB isolates*).

## Identifikasi BAL

Hasil identifikasi kesembilan bakteri asam laktat asal fermentasi TTKS termasuk dalam golongan Genus *Lactobacillus*.

## PEMBAHASAN

### Fermentasi Tandan Kosong Kelapa Sawit

Tandan kosong kelapa sawit memiliki komponen karbohidrat, polimer dari karbohidrat menghasilkan asam – asam organik dan senyawa glukosa. Penurunan pH ke – 1 dan minggu ke – 2 terjadi karna BAL menghasilkan asam organik berupa asam laktat dalam metabolismenya yang mengakibatkan pH media menjadi asam dan tidak sesuai untuk mikroorganisme lain untuk tumbuh (Kilinc *et al.*, 2006). Bakteri asam laktat memecahkan polimer pektin menjadi monomer yang lebih sederhana, yang menyebabkan pembentukan asam organik (Suharyono *et al.*, 2012). Kenaikan pH pada minggu ke – 3 dan Minggu ke – 4 disebabkan karna terbentuknya ammonia selama fermentasi dan kurangnya zat gizi pada media yang tidak menghasilkan asam laktat, tetapi lebih banyak menghasilkan metabolisme sekunder berupa bakteriosin (Sulistijowati *et al.*, 2020; Efendi *et al.*, 2017). Fermentasi oleh BAL akan menghasilkan asam sehingga menyebabkan pH menurun, namun selama metabolisme protein dan asam amino akan melepaskan ion amonium sehingga menyebabkan pH menjadi basa (Sarjana *et al.*, 2017). Bakteri berkontribusi dalam mendegradasi beberapa protein dan lemak membentuk senyawa yang lebih sederhana dan bersifat volatil selama proses waktu fermentasi (Rahayu, 2021).

Suhu erat kaitannya dengan sintesis enzim dalam mempengaruhi secara langsung pertumbuhan bakteri. Enzim merupakan bahan yang sangat dipengaruhi oleh suhu karena bersifat termolabil (Arivo & Annissatussholeha, 2017). Penurunan suhu terjadi akibat aktivitas mikroorganisme karena berkurangnya substrat gula yang bisa mengurangi panas pada proses fermentasi. Sumber gula akan teroksidasi menjadi CO<sub>2</sub> dan air sehingga terjadi panas menyebabkan suhu meningkat (Kusuma *et al.*, 2019). Bakteri memiliki rentang suhu untuk dapat bertahan hidup. Bakteri memiliki suhu minimum untuk bisa toleransi di suhu terendah, dan bakteri memiliki suhu maksimum untuk bisa toleransi di batas suhu tertinggi pertumbuhan (Elias *et al.*, 2014). Suhu air rendaman fermentasi TTKS ada pada kisaran 20°C hingga 29°C, yang dimana BAL masih mampu untuk tumbuh.

## Isolasi Dan Karakterisasi Isolat BAL

Populasi bakteri yang ditumbuhkan pada air fermentasi TKKS menggunakan media selektif MRSA yang ditambahkan  $\text{CaCO}_3$  1%. Senyawa  $\text{CaCO}_3$  adalah senyawa yang biasanya digunakan untuk memilih dan menyeleksi bakteri asam laktat yang akan membentuk zona bening, karena  $\text{CaCO}_3$  bereaksi dengan asam laktat menjadi kalsium laktat. Zona bening yang terbentuk menjadi karakterisasi awal dalam memilih BAL karena menunjukkan bahwa metabolit utama yang dihasilkan berupa asam laktat yang mampu melarutkan  $\text{CaCO}_3$  (Susilowati et al., 2022). Morfologi koloni dari 9 isolat hasil pemurnian memunculkan zona bening. Karakterisasi koloni dari kesembilan isolat menunjukkan ciri yang sama, seperti bentuk yang *circular*, memiliki margin *entire*, elevasi *convex*, dan warna putih ataupun putih susu. Menurut Susilowati et al., (2022) menyatakan morfologi BAL yang diisolasi dari susu kambing, isolat memiliki koloni berbentuk *circular* (bulat), berwarna putih, *opaque* (tidak dapat ditembus cahaya), *enpitire* (tepi rata) dan elevasi *convex*.

Pewarnaan gram berguna untuk melihat bentuk sel dan sifat yang dimiliki oleh bakteri (Ningsih et al., 2018). Berdasarkan hasil dari pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri diperoleh isolat TKS B2, TKS B3, TKS C6, TKS 7, TKS C9, TKS D5, dan TKS D6 berbentuk *bacill*, dan isolat TKS C3 dan TKS 11 berbentuk *streptobacill*. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri bergram positif berbentuk *coccus* atau *bacill* dan tidak memiliki spora (Wardani, 2018). Setelah pewarnaan Gram dilanjutkan dengan pewarnaan endospora. Berdasarkan dari pewarnaan endospora 34 isolat tidak memiliki spora (spora negatif) yang ditandai sel bakteri berwarna merah pada saat diwarnai dengan *malachite green*. Menurut Agustina et al., (2013) spora yang bebas akan berwarna hijau – biru dan apabila sel bakteri berwarna merah menandakan sel vegetatif. Hasil penelitian yang didapatkan Kurnia et al., (2020) menunjukkan hasil isolat BAL yang ditemukan pada makanan tradisional suku rejang berupa lemea yang tidak memiliki spora.

## Karakterisasi Isolat BAL Dengan Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu, uji katalase, uji motilitas, uji TSIA, uji MR, dan uji oksidase. Uji Katalase adalah uji yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase yang terdapat pada bakteri merupakan enzim yang berfungsi mengurai hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang terbentuk dari proses respirasi aerob terhadap bakteri, menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan oksigen ( $\text{O}_2$ ) (Sianipar et al., 2020). Berdasarkan uji katalase yang telah dilakukan kesembilan isolat katalase negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung. Bakteri asam laktat merupakan bakteri anaerob fakultatif yang menghasilkan enzim peroksidase yang tidak memecah  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi senyawa organik dan  $\text{H}_2\text{O}$  yang tidak menghasilkan gelembung udara (Hamidah et al., 2019).

Uji motilitas bertujuan dalam melihat pergerakan bakteri di dalam media tumbuh. Uji motilitas dilakukan dengan mengamati adanya rambatan – rambatan pada sekitar bekas tusukan di media. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan terhadap kesembilan isolat tidak ada pergerakan, sehingga menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat nonmotil. Berdasarkan hasil penelitian Falakh & Astri (2022) BAL dari Nira siwalan (*Borassus flabellifer L.*) memperoleh hasil yang negatif pada uji motilitas dengan tidak munculnya rambatan pada sekitar bekas tusukan ose.

Uji TSIA dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa yang terkandung dalam media. Berdasarkan hasil uji TSIA kesembilan isolat dapat memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa yang terdapat dalam medium sehingga keseluruhan media *slant* dan *butt* berubah warna menjadi kuning. Menurut Aini, (2018) menyatakan bahwa uji TSIA pada suatu bakteri dapat memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa bila media pada bagian atas dan bagian bawah berwarna kuning.

Berdasarkan hasil uji MR didapatkan kesembilan isolat menunjukkan hasil uji positif yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah pada saat di tetesi reagen MR, dapat diartikan bahwa telah terbentuknya asam. Perubahan warna yang terjadi pada medium disebabkan oleh penurunan pH medium akibat produk asam seperti asam laktat, asam asetat, asam suksinat, dan asam format yang terakumulasi selama fermentasi glukosa. Berdasarkan hasil penelitian Kursia et al. (2021), isolat bakteri asam laktat dari limbah sayur menunjukkan hasil positif pada uji MR.

Prinsip uji oksidase terjadi pada organisme yang mengandung sitokrom C menghasilkan intraseluler enzim yang dikenal enzim oksidase. Berdasarkan hasil penelitian uji oksidase kesembilan isolat positif ditandai dengan berubahnya warna menjadi warna *violet* pada saat ditetaskan dengan *reagen kovac*. Mikroorganisme aerobik dan anaerobik fakultatif mempunyai enzim sitokrom oksidase dan oksigen sebagai akseptor elektron, sehingga pengujian ini memberikan hasil positif. Perubahan warna ini disebabkan oleh oksidasi larutan *reagen* oksidase oleh sitokrom oksidase. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari pupuk organik cair isi rumen sapi menunjukkan hasil uji oksidase positif (Damayanti *et al.*, 2018).

Berdasarkan karakteristik yang diuji, sembilan isolat bakteri BAL yang ditemukan pada fermentasi TKKS merupakan BAL. Ciri-ciri BAL yang ditemukan pada kesembilan isolat yaitu gram positif, tidak berspora, memiliki ciri-ciri katalase negatif. Isolat BAL pada fermentasi TKKS dapat memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa dan mampu membentuk asam dengan adanya hasil positif pada uji MR.

### Uji Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba BAL yang diisolasi dari fermentasi TTKS dilakukan terhadap bakteri *E. coli* mewakili bakteri Gram negatif dan bakteri *S. aureus*. Berdasarkan hasil uji antimikroba dari kesembilan isolat menunjukkan bakteri asam laktat memiliki resistensi yang luas terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pada tabel 4 terdapat tiga isolat yaitu TKS C7, TKS C9 dan TKS C11 yang memiliki kemampuan antibakteri yang baik. TKS C7 memiliki ukuran diameter zona hambat 12,9 mm terhadap *S.aureus* dan 10,7 mm terhadap bakteri *E.coli*, isolat TKS C9 dengan ukuran diameter zona hambat 12,2 mm terhadap *S.aureus* dan 8,65 mm terhadap bakteri *E.coli*. Isolat TKS C11 mampu membentuk diameter zona hambat 12,1 mm terhadap *S.aureus* dan 8,54 mm terhadap bakteri *E.coli*. Beberapa hal yang mempengaruhi besar kecilnya zona hambat yang dibentuk isolat BAL terhadap bakteri uji adalah adanya interaksi antara kemampuan BAL dalam menghasilkan senyawa aktif atau enzim hidrolitik, umur bakteri, jumlah bakteri, senyawa aktif yang dihasilkan bakteri, komposisi medium, dan waktu inkubasi (Dewi, 2011; Datta *et al.*, 2019). Mekanisme metabolit bakteri asam laktat akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan menghasilkan asam organik (asam laktat, asam asetat, dan asam perogenik), diasetil, hidrogen peroksida, protein bakteriosin dan protein bakterisidal selama proses fermentasi laktat. Asam laktat yang terbentuk dapat berdifusi secara cepat ke dalam sel mikroorganisme yang bisa menyebabkan terjadinya pengasaman sitoplasma, pengamatan transfer substrat, dan sintesis makromolekul yang secara keseluruhan bisa menghambat pertumbuhan bakteri (Setianingsih, 2010).

### Uji Resistensi BAL Terhadap Antibiotik

Pada penelitian ini terdapat tiga isolat yang memiliki sifat resisten terhadap ampisilin, tetrasiklin dan kloramfenikol yaitu TKS C3, TKS C9 dan TKS C11. Sebagian besar isolat dapat dihambat oleh Ampisilin. Ampisilin adalah antibiotik yang berspektrum luas sehingga dapat membunuh bakteri Gram positif, bakteri anaerob, dan bakteri Gram negatif, merupakan antibiotik golongan bakterisidal. Resistensi terhadap ampisilin memiliki mekanisme utama yang akan melibatkan aktivasi oleh enzim hidrolitik  $\beta$ -laktamase (Jampur *et al.*, 2024; Rafailidis *et al.*, 2007). Struktur dinding sel bakteri asam laktat yang tersusun dari beberapa lapisan peptidoglikan yang tebal yang berfungsi untuk memberi integritas dan bentuk sel yang dapat menghambat masuknya senyawa antibiotik dengan cara menurunkan permeabilitas sehingga bisa menurunkan kemungkinan masuknya komponen antibiotik ke dalam sitoplasma sel (Sujadmiko dan Wikandari, 2017). Antibiotik tetrasiklin adalah antibiotik bakteristatik dan memiliki spektrum aktivitasnya yang luas. Bakteri asam laktat tahan terhadap antibiotik tetrasiklin karena terdapat kode genetika yang bisa meningkatkan kemungkinan sel bakteri untuk bertahan hidup. Menurut Anisimova & Yarullina (2018) menyatakan bahwa isolat *L. fermentum* mempunyai ketahanan terhadap antibiotik tetrasiklin diakibatkan adanya gen tet(K), tet(M), tet(W), tet(S), dan tet(L) pada bakteri tersebut. Bakteri *L. fermentum* mempunyai gen tet(K) yang dapat mengkodekan pompa *effluks*, dan tet(M) yang membantu dalam perlindungan ribosomal sel bakteri. Sebagian besar isolat bersifat resisten terhadap

kloramfenikol. Kloramfenikol adalah antibiotik yang bisa menghambat sintesis protein dengan cara mencegah pengikatan mRNA ke ribosom 50S (Berger, 1986). Kemampuan bakteri dalam bertahan terhadap antibiotik kloramfenikol dapat terjadi karena adanya gen *cat* yang dimiliki oleh sel (Schwarz *et al.*, 2004). Hummel *et al.*, (2007) menyatakan bahwa *Lactobacillus* bisa memiliki gen *cat* yang bersifat sensitif terhadap kloramfenikol.

### Uji Fisologi

Berdasarkan hasil uji terhadap ketahanan pH rendah dengan 3 perlakuan yang berbeda yaitu pH 2, 3, dan 4 menunjukkan bahwa kesembilan isolat mampu bertahan pada pH rendah yang ditandai adanya endapan pada suspensi media MRSB. Hasil uji MR juga mendukung bahwa isolate BAL memiliki kemampuan menghasilkan asam dan hasil uji kemampuan hidup pada pH rendah (2-4) menunjukkan hasil yang positif. Hasil uji ini mengidentifikasi bahwa semua isolat bisa digunakan dan berpotensi dikembangkan sebagai probiotik, karna mampu untuk melewati asam lambung. Resistensi bakteri asam laktat terhadap paparan asam dengan garam empedu diperlukan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya setelah mencapai usus besar (Fatma *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil pengamatan pada kesembilan isolat asal fermentasi TKKS terlihat bahwa isolat mampu tumbuh pada suhu 15°C, 27°C, 37°C, dan 45°C. Akan tetapi pertumbuhan bakteri terlihat lebih optimal pada suhu 27°C, 37°C, dan 45°C yang ditandai dengan adanya perubahan warna media yang lebih keruh dan adanya endapan pada permukaan bawah tabung reaksi. Isolat mampu disimpan pada suhu 15°C (suhu kulkas), 27°C (suhu ruang), 37°C (suhu inkubator), dan 45°C (suhu pengiriman), sehingga bakteri asam laktat termasuk ke dalam kelompok mesofilik dan termofilik. Mesofilik tumbuh pada kelompok bakteri suhu 20°C – 45°C dan termofilik dapat tumbuh pada suhu 45°C – 65°C (Abrar, 2013). Kemampuan hidup pada suhu 27-37° menunjukkan kemampuan bertahan hidup BAL ini jika dimanfaatkan sebagai pakan berprobiotik.

### Uji Hemolisis

Berdasarkan uji hemolisis pada media *blood agar* kesembilan isolat BAL dari fermentasi TKKS terlihat tidak munculnya zona hemolisis di sekeliling koloni sehingga bakteri tersebut bersifat gama (non patogen). Gamma hemolisis bisa terjadi ketika sel darah merah tidak mengalami lisis dan tidak ada pertumbuhan pada medium di sekitar koloni. Salah satu kriteria penting dalam memilih bakteri sebagai probiotik adalah bahwa bakteri tersebut tidak bersifat patogen atau toksik terhadap inangnya (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2008). Hasil penelitian ini menunjukkan semua isolat BAL berpotensi sebagai probiotik dapat digunakan sebagai pakan ternak karena bersifat non patogen.

### Uji Potensi Probiotik

#### *Populasi Bakteri Asam Laktat*

Hasil perhitungan populasi BAL memiliki viabilitas yang berbeda, viabilitas pada media MRSA+TKKS lebih baik dibandingkan viabilitas isolat bakteri asam laktat di media MRSB. Jumlah koloni bakteri asam laktat yang terkandung di media MRSB+TKKS yaitu sebanyak 7,04 – 9,41 Log CFU/mL, sedangkan jumlah koloni BAL yang terkandung di media MRSB adalah sebanyak 7,08 – 8,83 Log CFU/mL. Jumlah total BAL masih termasuk dalam batasan kandungan probiotik yang dianjurkan dalam standar produk probiotik yaitu 10<sup>5</sup>-10<sup>9</sup> koloni/ml (Shah, 2007; Diza *et al.*, 2016). Tingginya jumlah bakteri yang diperoleh dapat disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi media. Media MRSB+TKKS dengan perbandingan 10:1 mengandung komponen nutrisi yang lebih kompleks karena adanya penambahan TKKS dibandingkan media MRSB saja. Menurut Subagiyo *et al.* (2015) menyatakan bahwa penambahan komponen nutrisi baik sebagai sumber karbon, nitrogen dan fosfor menghasilkan peningkatan pertumbuhan dan kepadatan sel. Substrat TKKS memiliki kandungan glukosa yang tinggi, glukosa adalah bentuk karbohidrat yang paling sederhana (monosakarida), sehingga sangat memudahkan bakteri asam laktat dalam memanfaatkan sebagai sumber karbon utama pada awal pertumbuhan (Putra, 2020).

### *Persentase Kadar Asam Laktat*

Persentase kadar asam laktat pada isolat BAL asal fermentasi TKKS pada media MRSB lebih tinggi berkisar antara 0,54 – 2,73% dibandingkan dengan persentase di media MRSB+TKKS yang berkisar antara 0,56 – 2,11% hal ini terjadi karena bakteri asam laktat yang terkandung pada media MRSB+TKKS memerlukan waktu yang lebih lama untuk mengurai substrat, dibandingkan pada media MRSB yang lebih sederhana. Kompleksitas kandungan media dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri karena komponen sederhana yang dapat diserap sel dan digunakan untuk sintesis sel dan energi membutuhkan waktu lebih lama untuk diuraikan. Setelah mikroba masuk ke dalam suatu media, mikroba mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan baru (Jawetz *et al.*, 2005). Bakteri asam laktat mempunyai batasan optimal dalam memanfaatkan gula sebagai energi, sehingga tidak semua gula yang terkandung dalam produk dapat difermentasi menjadi asam laktat ataupun asam organik lainnya. Menurut Yeni *et al.* (2016) menyatakan banyak gula yang dikonsumsi bakteri digunakan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan sel dibandingkan, dengan pembentukan produk asam laktat. Oleh karena itu persentase kadar asam laktat pada media MRSB+TKKS lebih rendah dibandingkan media MRSB.

### **Uji Adhesi**

Salah satu dampak menguntungkan dari adhesi BAL ke sel usus yaitu kemampuannya menghambat pelekatan patogen. Probiotik yang diberikan harus mampu berkolonisasi dan secara kompetitif menyingkirkan patogen di saluran pencernaan (Kos *et al.*, 2003 ; Neal-McKinney *et al.*, 2012)). Berdasarkan hasil yang didapatkan isolat TKS D6 persentase pelekatan paling tinggi senilai (0,98%) yang masih melekat di lempeng tipis. Todoriki *et al.*, (2001) menyatakan bahwa bakteri *Lactobacillus* yang diisolasi dari saluran pencernaan memiliki kemampuan menempel yang lebih baik dibandingkan bakteri *Lactobacillus* dari makanan hasil fermentasi.

### **Identifikasi Bakteri**

Hasil identifikasi bakteri menunjukkan bahwa sembilan BAL asal fermentasi TKKS merupakan Genus *Lactobacillus*. Menurut Goldstein *et al.*, (2015) menyatakan bahwa *Lactobacillus* bersifat anaerobik fakultatif, katalase negatif, Gram positif, tidak membentuk spora, bentuk sel batang pendek, batang panjang dan ramping, dan berbentuk rantai atau palisade.

### **KESIMPULAN**

Isolat yang paling berpotensi sebagai bakteri probiotik yaitu isolat TKS C9 dan TKS C11. Isolat ini memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, bertahan pada suhu tinggi dan pH rendah, tidak bersifat patogen, mampu melakukan adhesi (perlekatan), memiliki kemampuan dalam berkoloni disuatu media sesuai standar produk probiotik yaitu  $10^7$ - $10^9$  CFU/ml, dan memiliki kadar asam laktat yang tinggi (2,73%). Jenis BAL yang terdapat pada fermentasi TKKS termasuk Genus *Lactobacillus*.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ketua Program Studi Biologi, Kepala dan staf Laboratorium Dasar Terpadu, Falkultas Sains dan Teknik, Universitas Bangka Belitung serta PT Gunung Maras Lestari POM, yang telah memfasilitasi penelitian ini.

### **KONTRIBUSI PENULIS**

FY merancang penelitian, mengumpulkan data dan membuat draft artikel; RL melakukan supervisi dan membuat draft artikel; HH merancang penelitian, menulis draft artikel dan merevisi naskah akhir.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M. 2013. Pengembangan Model Untuk Memprediksi Pengaruh Suhu Penyimpanan Terhadap Laju Pertumbuhan Bakteri Pada Susu Segar. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2), pp.109-112.
- Agustina, D., Vizar, C., & Nursanty, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*) Asin Berkitosan. *Biospecies*, 6(1), pp.15-19.
- Agustinur & Yusrizal. 2021. Isolasi Bakteri Selulolitik Indigenous Pendegradasi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 8(1), pp.150-155.
- Aini, F. 2018. Isolasi dan Identifikasi *Shigella sp.* Penyebab Diare pada Balita. *Biosite*, 4(1), pp.1-40.
- Anisimova, E., & Yarulina, D. 2018. Characterization of Erythromycin and Tetracycline Resistance in *Lactobacillus fermentum* Strains. *International Journal of Microbiology*, 2018, p.3912326.
- Azzahro, H.U., Indrasati, N.S., & Ismayana, A. 2022. Penerapan Produksi Bersih Pada Industri Kelapa Sawit Di PT YZ. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 32(1), pp.1-11.
- Arivo, D., & Annissatusholeha, N. 2017. Pengaruh Tekanan Osmotik, pH, dan suhu terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *J. Ilmu Kedokt. dan Kesehat*, 4(3), pp.153–160.
- Berger, S. A. 1986. *Antibiotika dan Infeksi*, Edisi pertama. CV. EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Damayanti, S.S., Komala, O., & Effendi, E. 2018. Identifikasi Bakteri Dari Pupuk Organik Cair Isi Rumen Sapi. *Ekologia : Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 18(2), pp.63-71.
- Datta, F.U., Daki, A.N., Benu, I., Detha, A.I.R., Foeh, N.E.D.H., & Ndaong, N.A. 2019. Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Cairan Rumen Terhadap Pertumbuhan *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Menggunakan Metode Difusi Sumur Agar. *Prosiding Seminar Nasional VII FKH Undana*, Swiss Bel-inn Kristal Kupang, pp.66-85.
- Dewanti, D. P. 2018. Potensi Selulosa dari Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit untuk Bahan Baku Bioplastik Ramah Lingkungan. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 19(1), pp.81-87.
- Dewi, K.A. 2011. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*, 31(2), pp.140-14.
- Diza, Y.H., Wahyuningsih, T., & Hermianti, W. 2016. Penentuan Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Cemar Mikroba Patogen Pada Yoghurt Bengkuang Selama Penyimpanan. *Jurnal Litbang Industri*, 6(1), pp.1-11.
- Efendi, Y., Yusra., & Efendi, V. O. 2017. Optimasi Potensi Bakteri *Bacillus subtilis* sebagai Sumber Enzim Protease. *Journal Akuatik Indonesia*, 2(1), pp.87-93.
- Elias, M.G., Wieczorek, S., Rosenne., & Tawfik, D.S. 2014. The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends Biochem. Sci*, 39(1), pp.1–7.
- Falakh, M.F., & Asri, M.T. 2022. Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Nira Swialan (*Borassus Flabellifer L.*) Sebagai Antimikroba Terhadap *Salmonella typhi*. *Lentera Bio*, 11(3), pp.514-524.
- Fatma, I.I., Nuraida, L., & Faridah, D.N. 2022. Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat Asal Madu dari Tiga Jenis Lebah Yang Berbeda. *J. Teknol. dan Industri Pangan*.
- Fijan, S. 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *J. Environ*, 11, pp.4745-4767.
- Firmandika, R., Afifah, U.N., & Sianipar, R.Y. 2023. Provinsi Kepulauan Bangka Belitung Dalam Angka 2023. BPS Provinsi Kepulauan Bangka Belitung.
- Giyatno, D.C., & Retnaningrum, E. 2020. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Dari Buah Kersen (*Muntingia calabura L.*). *Jurnal Sains Dasar*, 9(2), pp.42-49.
- Goldstein, E.J.C., Tyrrell, K.L., & Citron, D.M. 2015. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Researchgate*, 60, pp.98-107.
- Hamidah, M.N., Rianingsih, L., & Romadhon. 2019. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Papeda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* dan *S.aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), pp.11-21

- Haryanti, A., Sholiha, P.S.F., & Putri, N.P. 2014. Studi Pemanfaatan Limbah Padatan Kelapa Sawit. *Konversi*, 3(2), pp.57-66.
- Hummel, A.C., Hertel, W., Holzappel C., & Franz. 2007. Antibiotic Resistences of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 73(9), p.730.
- Jampur, S.W.P., Tangkonda, E., & Laut, M.M. 2024. Uji Resistensi *Campylobacter* sp. Yang Diisolasi Dari Rusa Timor (*Rusa Timoroensis*) Terhadap Antibiotik. *Jurnal Veteriner Nusantara*, VII(3), pp.1-10.
- Jawetz., Melnick., & Adelbergs. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika. Jakarta.
- Kementerian Perindustrian Republik Indonesia. 2020. Gambaran Sekilas Industri Minyak Kelapa Sawit. diakses dari <https://kemenperin.go.id/artikel/22348/Industri-Produk-Sawit-Nasional>, pada 15 April 2024.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., & Lategan, M.J. 2008. Probiotic In Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms. *Aquaculture*, 274, pp.1-14.
- Kilinc, B., Cakli, S., Tolasa, S., & Dincer, T. 2006. Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing. *Journal of Food*, 222 (5), pp.604-613.
- Kos, B.J., Sudkovic, S., Vukovic, M., Simpraga, J., Frece., & Matosic, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol*, 94, pp.981-987.
- Kurnia, M., Amir, H., & Handayani, D. 2020. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Makanan Tradisional Suku Rejang. *ALOTROP Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*, 4(1), pp.25-32.
- Kursia, S., Imrawati., Ismail., Halim, A., Ramadhani, N., Ramadhani, F., Priska, F., & Hanifah, F. 2020. Identifikasi Biokimia Dan Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Limbah Sayur Bayam. *Media Farmasi p.issn*, XVI(1), pp.21-32.
- Kusuma, A.P., Chuzaemi, S., & Mashudi. 2019. Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Limbah Buah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) Terhadap Kualitas Fisik dan Kandungan Nutrien Menggunakan *Aspergillus niger*. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis*, 2(1), pp.1-9.
- Lehninger. 1982. Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1. Jakarta: Erlangga.
- Manu, K.R., Tangkonda, E., & Gelolodo, M. A. 2019. Isolasi dan identifikasi terhadap bakteri penyebab mastitis pada sapi perah di Desa Benluto Kecamatan Batu Putih Kabupaten Timor Tengah Selatan. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 2(2), pp.10-19.
- Muchtadi, D. 2009. *Pengantar Ilmu Gizi*. Alfabeta: Bandung.
- Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D.R., Shah, D.R., dan Konkel, M.E. 2012. Production of Organic Acids by Probiotic *Lactobacilli* Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *Plos One*, 74, pp.177-188.
- Ningsih, N.P., Sari, R., & Apridamayanti, P. 2018. Optimasi Aktivitas Bakteriosin yang Dihasilkan oleh *Lactobacillus brevis* dari Es Pisang Ijo. *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*, 7(2), pp.233-242.
- Nurchahyo, H., Yulianti, E., Hasana, H., Ariyanti, D.D. dan Saputri, P., 2017, Isolasi Bakteri Kandidat Probiotik dari Isi Usus Halus Ayam Kampung Untuk Meningkatkan Produktivitas Ayam Pedaging, *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Biologi*. Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Yogyakarta, pp.B-139 – B-148.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Gil-Campos, M., & Gil, A. 2019. Mechanisms of Action of Probiotics. *American Society For Nutrition*, 10, pp.S49-S66.
- Pratiwi, N.P.I.I., Suardana, I.W., & Suarsana, I.N. 2017. Karakterisasi Fisikokimia dan Uji Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat Isolat 13 B Hasil Isolasi Kolon Sapi Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*, 6(4), pp.278-287.
- Priadi, G., Setiyoningrum, F., Afiati, F., Irzaldi, R., dan Lisdiyanti, P. 2020. Studi In Vitro Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik dari Makanan Fermentasi Indonesia. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 31(1), pp.21-28.

- Pundir, R.K., Rana, S., Kashyap, N., & Kaur, A. 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(03), pp.85-93.
- Putra, R.P. 2020. Potensi Prebiotik Tepung Pisang yang Dimodifikasi Menggunakan Pemanasan Autoklaf Dilanjutkan dengan Retrogradasi. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. 6(2), pp.349 – 360.
- Putri, D.M., Budiharjo, A., & Kusdiyantini, E. 2014. Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam Laktat, dan Analisis Proksimat dari Pangan Fermentasi Rusip Ikan Teri (*Stolephorus sp.*). *Jurnal Biologi*, 3(2), pp.11-9.
- Rafailidis, I.P., Ioannidou, N.E., dan Falagas, E.M. 2007. Ampicillin/ Sulbactam: Current Status in Severe Bacterial Infections. *Drugs*, 67(13), pp.1829–1849.
- Rahayu, I. 2021. *Isolasi Mikroorganisme Pendegradasi Selulosa Pada Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)*. Skripsi. Prodi Kimia, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Rahmayetty., Barleany, D.R., Irawan, Anton., & Suhendi, E. 2015. *Sintesa Asam Laktat Berbahan Baku Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Trichoderma Reesei dan Lactobacillus Acidipillus*. Universitas Muhammadiyah Jakarta.
- Rasyid, B., Sandi, K.M., Sudarmanto, I.G., & Karta, I.W. 2021. Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Blondo Virgin Cocout Oil terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedica*, 13(1), pp.56-67.
- Sarjana, T.A., Mahfudz, L.D., Ramadhan, M., Sugiharto., Whyono, F., & Sumarsih, S. 2017. Emisi Ammonia dan Kondisi Litter Pada Kandang Ayam Boiler Sistem Terbuka yang Mendapatkan Additif Berbeda dan Kombinasinya dalam Ransum. *Prosiding Seminar Pengembangan Peternakan Berkelanjutan*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung, pp.580-586.
- Schwarz, S., C., Kehrenberg, B., Doublet, dan A., Cloeckert. 2004. Molecular Basis of Bacterial Resistance to Chloramphenicol and Florfenicol. *FEMS Microbiol*, 28(5), p.519.
- Setianingsih S. 2010. *Kajian Senyawa Antimikroba Bakteri Asam Laktat Homofermentatif Isolat ASI*. Skripsi. Prodi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), pp.1262-1277.
- Sianipar, G.W.S., Sartini., & Riyanto. 2020. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Endofit pada Akar Pepaya (*Carica papaya L.*). *Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA)*, 2(2), 83-92.
- Somashekaraiah, R., Shruthi, B., Deepthi, B.V., & Sreenivasa, M.Y. 2019. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Neera: A Naturally Fermenting Coconut Palm Nectar. *Original Research*, 10, pp.1-11.
- Subagiyo., Margino, S., & Triyanto. 2015. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen Dan Fosfor pada Medium de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih 85 yang Diisolasi dari Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis*, 18(3), pp.127–132.
- Suharyono., Rizal, S., Nurainy, F., & Kurniadi, M. 2012. Pertumbuhan L. Casei Pada Berbagai Lama Fermentasi Minimum Sinbiotik Dari Ekstrak Cincau 86 Hijau (*Premna Oblongifolia* Merr). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, V(2), pp.117-128.
- Sujadmiko, W. K., & Wikandari, P.R. 2017. Resistensi Antibiotik Amoksisilin Pada Strain *Lactobacillus plantarum* B1765 Sebagai Kandidat Kultur Probiotik. *UNESA Journal of Chemistry*, VI(1), 54-58.
- Sulistijowati, R., Ladja., T.J., & Harmain, R.M. 2020. Perubahan nilai pH dan Jumlah Bakteri Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Hasil Pengawetan Larutan Daun Matoa (*Pometia pinnata*). *Media Teknologi Hasil Perinan*, 8(2), pp.76–81.
- Susilowati, A.Y., Jannah, S.N., Kusumaningrum, H.P., & Sulistiani. 2022. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kambing Sebagai Bakteri *Antagonis Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* Penyebab Foodborne Disease. *Jurnal Teknologi Pangan*, 6(2), pp.33-41.

- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., & Toba, T. 2001. Inhibition of Adhesion of Food-borne Pathogens to Caco-2 Cells by *Lactobacillus* Strains. *J Appl Microbiol*, 91, pp.154-159.
- Trisakti, B., Mhardela, P., Husaini, T., Irvan., & Daimon, H. 2018. Production of oil palm empty fruit bunch compost for ornamental plant cultivation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 309, pp.1-8.
- Urnemi. 2012. *Isolasi, Penentuan Antimikrobia Dan Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (Theobroma cacao Lin) Asal Sumatra Barat Dan Aplikasinya Untuk Masyarakat*. Disertasi. Prodi Ilmu Kimia, Program Pascasarjana, Universitas Andalas.
- Wardani, Y.A. 2018. *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Jejunum Kelinci (Oryctolagus cuniculus) Sebagai Kandidat Probiotik*. Skripsi. Prodi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.
- Yeni., Maryandini, A., & Sunarti, T.C. 2016. Penggunaan Substrat Whey Tahu Untuk Produksi Biomassa Oleh *Pediococcus Pentosaceus* E.1222. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 26 (3), pp.284 – 293.