

**Abstract.** *Wadi is a sort of fermented fish product from Dayak tribe in Central Kalimantan. Wadi is made with the addition of lumu, sugar, and salt, and fermented for 7-10 x 24 hours. During the fermentation process, there are microflora from fish, and microflora from lumu that play a role in fermentation process. Some species of bacteria that play a role in the wadi fermentation process are lipolytic bacteria and Lactic Acid Bacteria (LAB). This research aims to: (1) identify the species of lipolytic bacteria and LAB that present in the wadi, (2) determine the lipid hydrolysis index and lactic acid clearance zone index of lipolytic bacteria and LAB that present in the wadi, and (3) determine the species of lipolytic bacteria and LAB which have highest ability to hydrolyze lipid and have the highest ability to produce lactic acid based on lipid hydrolysis index and lactic acid clearance zone index. The results showed that, (1) there are four species of lipolytic bacteria and LAB present in wadi: *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Nitrococcus mobilis* and *Streptococcus lactis*; (2) the four species of bacteria have different lipid hydrolysis index and lactic acid clearance zone index which are *Lactobacillus coryniformis* has a lipid hydrolysis index of 1.63 and lactic acid clearance zone index of 3.31; *Lactobacillus casei* has index of 1.94 and 3.96; *Streptococcus lactis* has index of 1.51 and 1.54 and *Nitrococcus mobilis* has index of 0.98 and 1.52; (3) *Lactobacillus casei* is a species of lipolytic bacteria and LAB which has the highest ability to hydrolyze lipid and to produce the highest lactic acid based on the lipid hydrolysis index and lactic acid clearance zone index, which are 1.94 and 3.96.*

**Keywords:** *lipolytic bacteria, LAB, lipid hydrolysis index, lactic acid clearance zone, wadi.*

**Mirza Yanuar Rizky**  
Universitas Negeri Malang  
Indonesia  
**Rizka Diah Fitri**  
Universitas Negeri Malang  
Indonesia  
**Utami Sri Hastuti**  
Universitas Negeri Malang  
Indonesia  
**Sitoresmi Prabaningtyas**  
Universitas Negeri Malang  
Indonesia

## Identifikasi Uji Kemampuan Hidrolisis Lemak Dan Penentuan Indeks Zona Bening Asam Laktat Pada Bakteri Dalam Wadi Makanan Traditional Kalimantan Tengah

**Mirza Yanuar Rizky**  
**Rizka Diah Fitri**  
**Utami Sri Hastuti**  
**Sitoresmi Prabaningtyas**

**Abstrak.** Wadi adalah jenis produk ikan fermentasi dari suku Dayak di Kalimantan Tengah. Wadi dibuat dengan penambahan lumu, gula, dan garam, dan difermentasi selama 7-10 x 24 jam. Selama proses fermentasi, ada mikroflora dari ikan, dan mikroflora dari lumu yang berperan dalam proses fermentasi. Beberapa spesies bakteri yang berperan dalam proses fermentasi wadi adalah bakteri lipolitik dan Lactic Acid Bacteria (LAB). Penelitian ini bertujuan untuk: (1) mengidentifikasi spesies bakteri lipolitik dan LAB yang ada di wadi, (2) menentukan indeks hidrolisis lipid dan indeks zona kliren asam laktat bakteri lipolitik dan LAB yang ada di wadi, dan (3.) menentukan spesies bakteri lipolitik dan LAB yang memiliki kemampuan tertinggi untuk menghidrolisis lipid dan memiliki kemampuan tertinggi untuk menghasilkan asam laktat berdasarkan indeks hidrolisis lipid dan indeks zona laktat asam izin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, (1) ada empat spesies bakteri lipolitik dan LAB hadir dalam wadi: *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Nitrococcus mobilis* dan *Streptococcus lactis*; (2) keempat spesies bakteri memiliki indeks hidrolisis lipid dan indeks zona laktat asam laktat yang berbeda yaitu *Lactobacillus coryniformis* memiliki indeks hidrolisis lipid sebesar 1,63 dan indeks zona asam laktat 3,31; *Lactobacillus casei* memiliki indeks 1,94 dan 3,96; *Streptococcus lactis* memiliki indeks 1,51 dan 1,54 dan *Nitrococcus mobilis* memiliki indeks 0,98 dan 1,52; (3) *Lactobacillus casei* adalah spesies bakteri lipolitik dan LAB yang memiliki kemampuan tertinggi untuk menghidrolisis lipid dan menghasilkan asam laktat tertinggi berdasarkan indeks hidrolisis lipid dan indeks zona asam laktat, yaitu 1,94 dan 3,96.

**Kata kunci:** *bakteri lipolitik, LAB, indeks hidrolisis lipid, zona bebas asam laktat, wadi.*

### Pendahuluan

Wadi ialah salah satu jenis makanan khas Kalimantan Tengah yang terbuat dari hasil fermentasi berbahan dasar ikan ataupun daging hewan lainnya (Dewi *et al*, 2015). Wadi dibuat dari ikan segar yang difermentasi dengan penambahan garam dan lumu, kemudian difermentasikan selama 7-10 hari. Setelah proses fermentasi selesai, wadi tersebut dapat diolah menjadi suatu hidangan lauk pauk (Restu, 2013; Khairina dan Khotimah, 2006). Wadi memiliki rasa dan aroma khas, yang dihasilkan dari proses fermentasi didalamnya. Rasa khas yang sebagian besar dihasilkan dari wadi yaitu rasa asin. Rasa asin tersebut dihasilkan karena penambahan garam yang dilakukan pada proses pembuatannya (Khairina dan Khotimah, 2006). Bahan dasar wadi yang paling sering digunakan adalah ikan air tawar; salah satu diantaranya ialah ikan patin (*Pangasius sp.*). Ikan patin merupakan salah satu jenis ikan air tawar dan termasuk salah satu jenis ikan dari kelompok

ikan yang penting di dunia, dikarenakan daging ikan patin memiliki cita rasa yang enak, dan gurih. Daging ikan patin juga mengandung nutrisi yang tinggi yaitu, mengandung protein sebesar 68,6%, lemak 5,8%, abu 3,5%, dan air 59,3% (Kordi, 2010).

Selama proses fermentasi ikan patin menjadi wadi ikan patin, terdapat mikroflora yang berasal dari ikan, serta mikroflora dari lumu yang dapat membantu proses fermentasi. Kelompok mikroflora yang berperan selama proses fermentasi wadi adalah bakteri halofilik yang bersifat proteolitik, amilolitik, lipolitik dan BAL (Khairina, 1998).

Terdapat beberapa spesies bakteri yang berperan dalam proses fermentasi wadi memiliki kemampuan menghidrolisis senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, salah satu diantaranya ialah bakteri lipolitik yang mampu menghidrolisis lemak. Lemak yang sudah terurai menjadi asam lemak dan gliserol akan memudahkan sistem pencernaan untuk menyerap nutrisi tersebut ke dalam tubuh, selain itu terurainya lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana berkontribusi besar terhadap pembentukan aroma dan citarasa. Pembentukan aroma dan citarasa pada wadi juga dipengaruhi oleh aktivitas Bakteri Asam Laktat yang terdapat di dalam wadi.

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk fermentasi utama (Masood *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2008). BAL menghasilkan asam laktat dari karbohidrat melalui proses fermentasi, yakni menghasilkan enzim amilase ekstraseluler dan memfermentasi karbohidrat secara menjadi asam laktat (Reddy *et al.*, 2008). Penentuan suatu bakteri yang termasuk spesies bakteri lipolitik dan BAL dapat dilakukan melalui teknik tertentu.

Salah satu produk kearifan lokal suku Dayak seperti wadi diharapkan dapat lebih dikenal oleh masyarakat secara luas, sehingga dapat meningkatkan nilai – nilai kearifan lokal khususnya di Kalimantan Tengah dan di Indonesia secara umum. Usaha dalam mencapai hal tersebut dapat dilakukan dengan melakukan penelitian tentang wadi.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) mengidentifikasi spesies-spesies bakteri lipolitik dan BAL yang terdapat dalam wadi, (2) menentukan indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat pada spesies-spesies bakteri lipolitik dan BAL dalam wadi, (3) menentukan spesies bakteri lipolitik dan BAL yang mempunyai kemampuan menghidrolisis lemak serta memiliki kemampuan menghasilkan asam laktat tertinggi berdasarkan indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat.

## Metode Penelitian

### *Alat dan Bahan*

Alat yang digunakan yaitu Otoklaf, beaker glass, cawan petri, tabung reaksi, cawan petri, mikroskop, labu erlenmeyer, makropipet, mikropipet, kompor gas, batang pengaduk, jarum inokulasi, LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, lampu spiritus, kaca benda, kaca penutup, mikroskop, inkubator, rak tabung reaksi dan jangka sorong. Bahan yang digunakan wadi ikan patin dengan lumu, *aluminium foil*, kapas, kertas coklat sampul, tissue, benang *wool*, karet gelang, kantong plastik, selotip, kertas label, *aquades*, larutan amonium oksalat kristal violet, larutan safranin, larutan hijau malakit, larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  20%, alkohol 70%, pepton, minyak zaitun, *Tween-80*, NaCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , metil merah, agar, media *Plate Count Agar* (PCA) *Instant*, media *de Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA), *Aquades*,  $\text{CaCO}_3$ , dan media *Nutrient Agar* (NA) *Instant*.

### *Prosedur Penelitian*

#### a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, pada tekanan 15 psi selama 15 menit.

**b. Isolasi Bakteri dalam Wadi**

Wadi ikan patin ditimbang sebanyak 10 gram lalu dihaluskan dengan mortar dan pistil kemudian dilarutkan dalam 90 mL larutan air pepton 0,1% sehingga diperoleh larutan sampel pada tingkat pengenceran  $10^{-1}$ . Setelah itu, dilakukan pengenceran secara bertingkat sehingga diperoleh pengenceran pada tingkat  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-6}$  kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1x24 jam. Masing-masing isolat bakteri yang tumbuh pada media PCA lalu diisolasi pada media miring NA.

**c. Penentuan Isolat Bakteri Lipolitik**

Masing-masing isolat bakteri yang tumbuh pada medium miring NA kemudian diinokulasikan dengan menggunakan jarum inokulasi ujung lurus pada media NA + Lemak (minyak zaitun) yang dimodifikasi dari Bestari dan Suharjono (2015). Komposisi media selektif ini antara lain pepton, minyak zaitun, Tween-80, NaCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , metil merah dan agar. Proses inokulasi dilakukan secara aseptik di *Laminar Air Flow* (LAF) dengan metode zig-zag. Selanjutnya dilakukan pemilihan isolat bakteri yang membentuk zona bening di sekeliling koloni bakteri. Koloni bakteri yang dapat membentuk zona bening di sekelilingnya termasuk bakteri lipolitik.

**d. Penentuan Isolat Bakteri Asam Laktat**

Masing-masing isolat bakteri yang tumbuh pada medium miring NA diinokulasikan dengan menggunakan jarum inokulasi ujung lurus pada medium MRSA +  $\text{CaCO}_3$  0,5%. Proses inokulasi dilakukan secara aseptik di *Laminar Air Flow* (LAF) dengan metode zig-zag, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , selama 2 x 24 jam. Isolat bakteri yang termasuk dalam BAL akan membentuk zona bening di sekeliling koloni bakteri.

**e. Deskripsi Ciri-ciri Morfologi Koloni, Mikroskopis dan Fisiologis Bakteri Lipolitik dan BAL**

Deskripsi ciri-ciri morfologi koloni bakteri lipolitik dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam media NA lempeng dengan metode *Streak Plate* agar didapatkan satu koloni yang terpisah. Deskripsi morfologi koloni bakteri meliputi warna, bentuk, diameter, tepi, elevasi, kepekatan dan suram atau tidaknya koloni bakteri. Deskripsi ciri-ciri mikroskopis dan fisiologis bakteri meliputi pengamatan sifat Gram, bentuk sel, spora, kapsula, motilitas dan tipe respirasi bakteri.

**f. Identifikasi Spesies Bakteri Lipolitik dalam Wadi**

Masing-masing isolat bakteri diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

**g. Pengujian Kemampuan Bakteri Lipolitik dalam Menghidrolisis Lemak**

Koloni bakteri yang membentuk zona bening di sekitarnya dan setelah diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 x 24 pada media NA+L yang dimodifikasi merupakan bakteri lipolitik. Koloni bakteri tersebut diinokulasi secara aseptik di *Laminar Air Flow* (LAF) pada media yang sama dengan metode kuadran dan membagi media menjadi empat kuadran. Selanjutnya ditentukan indeks hidrolisis pada masing-masing isolat bakteri lipolitik yang diperoleh. Indeks hidrolisis dapat diketahui berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk pada media tersebut. Dimodifikasi dari Melliawati *et al.*, (2015) indeks hidrolisis ditentukan dengan rumus:

$$\text{Indeks hidrolisis} = \frac{\text{diameter zona bening}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

Menurut Widyawati *et al.* (2010) besar kecilnya indeks hidrolisis dapat digunakan sebagai parameter atas kuat atau lemahnya kemampuan bakteri dalam menghidrolisis senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana

**h. Pengujian kemampuan Bakteri Asam Laktat dalam menghasilkan asam laktat (Melliawati *et al.*, 2015)**

Koloni bakteri yang membentuk zona bening disekitarnya, setelah diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 x 24 jam pada media MRSA yang telah ditambahkan  $\text{CaCO}_3$  0,5% merupakan

bakteri yang termasuk dalam spesies BAL. Koloni bakteri tersebut kemudian diinokulasi secara aseptik di *Laminar Air Flow* (LAF) pada media yang sama dengan metode kuadran. Diameter Zona bening yang dihasilkan oleh koloni bakteri tersebut diukur dengan menggunakan jangka sorong. Rumus perhitungan nilai Indeks Zona Bening Asam Laktat berdasarkan Melliawati *et al.*, (2015) yaitu:

$$\text{Indeks Zona Bening Asam Laktat} = \frac{\text{Diameter Zona Bening Asam Laktat}}{\text{Diameter koKoloni Bakteri}}$$

Koloni bakteri yang menghasilkan zona bening terbesar merupakan spesies BAL yang paling efektif dalam menghasilkan asam laktat pada wadi.

## Hasil dan Pembahasan

Pada tahap isolasi didapatkan sebanyak 10 isolat koloni bakteri. Masing-masing isolat koloni bakteri tersebut kemudian diberi kode, yaitu: A, B, C, D, E, F, G, H, I dan J. Isolat bakteri ini kemudian diseleksi kemampuannya dalam menghidrolisis lemak dengan menggunakan media selektif NA+L yang dimodifikasi dan masing-masing isolat tersebut ditumbuhkan pada media selektif BAL yaitu, media MRSA (*de Man, Rogosa, dan Sharpe Agar*). Hasil seleksi masing – masing isolat bakteri yang bersifat lipolitik dan termasuk BAL dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Isolasi dan Seleksi Bakteri Lipolitik**

No.	Kode Isolat Bakteri	Keterangan
1.	A	-
2.	B	+
3.	C	+
4.	D	-
5.	E	+
6.	F	+
7.	G	-
8.	H	-
9.	I	+
10.	J	+

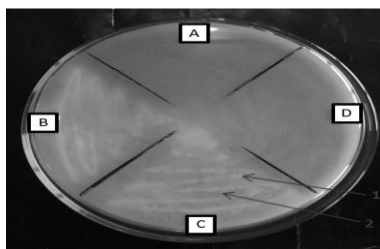
Keterangan:

(+) = Bakteri lipolitik dan termasuk BAL

(-) = Bukan bakteri lipolitik dan bukan termasuk BAL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 10 isolat terdapat 6 isolat bakteri yang bersifat lipolitik dan termasuk BAL, yaitu bakteri dengan kode B, C, E, F, I dan J. Bakteri lipolitik dapat menghidrolisis lemak yang terkandung dalam media NA+L yang dimodifikasi, sehingga terbentuk asam lemak dan gliserol. Media tersebut ditambahkan lemak berupa minyak zaitun yang berfungsi sebagai substrat yang akan dihidrolisis oleh bakteri lipolitik. Isolat bakteri yang bersifat lipolitik akan menghasilkan zona bening disekitar koloni bakteri.

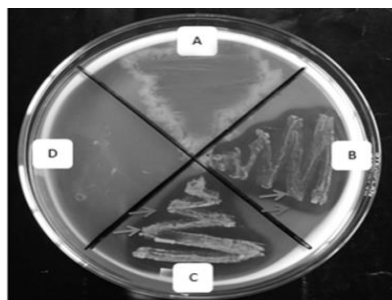
Zona bening yang terbentuk disebabkan karena adanya degradasi lemak yang terdapat pada media menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana. Muharni dkk. (2015) menyatakan, terbentuknya endapan asam lemak yang berwarna putih (Gambar 1) menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan lipase. Lemak (minyak zaitun dan *Tween-80*) yang sudah terhidrolisis akan menghasilkan asam lemak, dimana asam lemak bebas ini berikatan dengan Kalsium ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) yang telah menyatu dengan media. Kompleks kalsium dengan asam lemak tersebut dapat teramati sebagai endapan putih keruh di sekitar koloni (Rajan *et al.*, 2011).



**Gambar 1. Hasil seleksi bakteri lipolitik. (1) koloni bakteri lipolitik dan (2) zona bening di sekitar koloni bakteri lipolitik (Sumber: Dokumen pribadi, 2017).**

Kemampuan bakteri dalam mensekresikan enzim ekstraselular merupakan mekanisme adaptasi terhadap lingkungan tempat ia tumbuh. Kehadiran lemak pada lingkungan bakteri, dalam penelitian ini wadi, telah memicu sekresi lipase ekstraselular untuk pemecahan lemak menjadi asam lemak dan gliserol sehingga dapat digunakan oleh bakteri tersebut sebagai sumber karbon (Lee *et al.*, 2015).

Seleksi BAL dilakukan berdasarkan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media MRSA yang ditambah dengan  $\text{CaCO}_3$  0.5%, dan telah diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 x 24 jam. Koloni bakteri yang membentuk zona bening (lihat Gambar 2). di sekitarnya, tergolong BAL dan koloni bakteri yang tidak membentuk zona bening di sekitarnya, tidak tergolong BAL (Nudyanto dan Zubaidah, 2015; Melliawati *et al.*, 2015).



**Gambar 2. Hasil seleksi bakteri asam laktat (BAL) pada media MRSA**

Keterangan: Isolat B dan C positif BAL, yang ditunjukkan dengan adanya zona bening (→) di sekitar koloni BAL (→), Isolat A dan D tidak tergolong BAL (Sumber: Dokumen Pribadi, 2017).

BAL dapat tumbuh dalam wadi karena terdapat nutrisi yang mendukung pertumbuhannya. Kandungan nutrisi dalam wadi, khususnya karbohidrat merupakan salah satu faktor utama yang dapat menunjang pertumbuhan BAL. Faktor lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan BAL adalah pH lingkungan dan suhu. pH wadi berkisar antara pH 6-6.5 dan suhu pemeraman wadi berkisar antara  $27^\circ\text{C}$ - $28^\circ\text{C}$ . Suhu dan pH tersebut merupakan kondisi lingkungan yang optimal, untuk pertumbuhan dan produksi asam laktat pada BAL. pH optimal untuk pertumbuhan BAL berkisar antara 6-6,5 dan mengalami penurunan pada pH 7, sedangkan suhu optimal pertumbuhan BAL bervariasi antara  $20^\circ\text{C}$ -  $45^\circ\text{C}$ , dan pada suhu  $37^\circ\text{C}$ -  $40^\circ\text{C}$  merupakan kondisi optimal bagi BAL untuk menghasilkan asam laktat (Patel and Parikh, 2016).

Tahap selanjutnya adalah melakukan deskripsi morfologi, mikroskopis dan fisiologi dari masing-masing koloni bakteri lipolitik dan BAL. Deskripsi morfologi dari masing-masing isolat menunjukkan bahwa setiap isolat bakteri tersebut memiliki perbedaan morfologi koloni berdasarkan warna koloni, diameter koloni, kepekatan, elevasi, bentuk koloni, dan mengkilat atau suramnya koloni.

Secara mikroskopis terdapat, 4 isolat bakteri yang termasuk bakteri gram positif, yaitu kode isolat B, C, E, dan J, dan dua isolat bakteri yang termasuk gram negatif, yaitu kode isolat F dan I.

Bentuk sel dari empat isolat BAL berbentuk kokus, yaitu pada kode isolat E, F, I, dan J, sedangkan dua isolat lainnya, yaitu kode isolat B dan C berbentuk basil. Empat isolat BAL memiliki kapsula, yaitu kode isolat B, E, F, dan J dan dua isolat lainnya, yaitu kode isolat C dan I tidak memiliki kapsula. Semua isolat BAL yang ditemukan pada wadi tersebut tidak membentuk spora, bersifat non motil, dan memiliki tipe respirasi anaerob fakultatif.

Berdasarkan hasil seleksi dan identifikasi bakteri lipolitik dan BAL pada wadi diperoleh empat spesies BAL. Keempat spesies bakteri tersebut ialah *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, dan *Nitrococcus mobilis* (Tabel 2).

**Tabel 2. Hasil identifikasi masing-masing isolat bakteri lipolitik dan BAL**

No	Kode Isolat	Spesies
1	B	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
2	C	<i>Lactobacillus casei</i>
3	E	<i>Streptococcus lactis</i>
4	F	<i>Nitrococcus mobilis</i>
5	I	<i>Nitrococcus mobilis</i>
6	J	<i>Streptococcus lactis</i>

Sebagian besar BAL yang ditemukan pada fermentasi ikan merupakan mikroflora yang terdapat pada ikan, namun beberapa bakteri tersebut tidak dapat bertahan dengan konsentrasi Natrium Klorida yang tinggi, sehingga akan tereliminasi secara bertahap. Hanya bakteri yang dapat bertahan dalam kondisi Natrium Klorida tinggi (bakteri halophilic) yang akan bertahan selama proses fermentasi. Genus *Lactobacillus* dapat ditemukan pada produk fermentasi ikan, karena genus tersebut termasuk golongan bakteri yang tumbuh dalam usus ikan dalam jumlah yang relatif tinggi (Kongo *et al*, 2013). Jenis BAL ditemukan pada ikan bervariasi tergantung pada spesies ikan yang digunakan dan letak geografis (Desniar, 2015). Berdasarkan informasi tersebut, maka dapat diketahui bahwa hampir semua spesies BAL yang ditemukan dalam penelitian merupakan spesies-spesies bakteri yang berasal dari ikan patin.

Penghitungan indeks hidrolisis lemak pada masing-masing spesies bakteri lipolitik bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri lipolitik dalam menghidrolisis lemak, begitu juga dengan penghitungan indeks zona bening asam laktat bertujuan untuk mengetahui kemampuan BAL tersebut dalam menghasilkan asam laktat. Penentuan kemampuan lipolitik pada bakteri dilakukan dengan menggunakan media NA + Lemak yang dimodifikasi dan penentuan kemampuan bakteri dalam menghasilkan asam laktat dilakukan dengan menggunakan media MRSA.

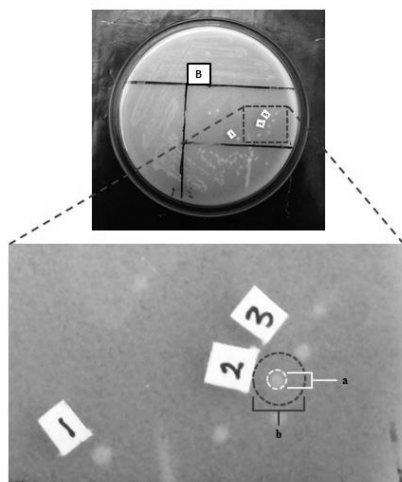
Penentuan tersebut dilakukan dengan metode *Quadrant Streak Plate*. Metode ini digunakan untuk mengetahui besar diameter koloni dan diameter zona bening yang dibentuk oleh bakteri lipolitik (Gambar 3.) dan BAL (Gambar 4.), sehingga dapat dihitung indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat yang dimiliki oleh tiap spesies bakteri yang ditemukan. Pengukuran indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat dilakukan pada 3 koloni untuk setiap spesies bakteri dan kemudian dihitung reratanya. Besarnya diameter zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong. Indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat pada masing-masing spesies dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

**Tabel 3. Hasil penghitungan indeks hidrolisis lemak pada masing-masing spesies bakteri lipolitik**

Nama Bakteri	Koloni	Diame-ter Koloni (cm)	Diame-ter Zona Bening (cm)	Indeks Hidrolisis
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	I	0,175	0,245	1,40
	II	0,130	0,220	1,69
	III	0,125	0,225	1,80
	<b>Rerata</b>			<b>1,63</b>
<i>Lactobacillus casei</i>	I	0,150	0,325	2,17
	II	0,110	0,220	2,00
	III	0,135	0,225	1,67
	<b>Rerata</b>			<b>1,94</b>
<i>Streptococcus lactis</i>	I	0,190	0,260	1,37
	II	0,150	0,220	1,47
	III	0,100	0,170	1,70
	<b>Rerata</b>			<b>1,51</b>
<i>Nitrococcus mobilis</i>	I	0,100	0,130	1,30
	II	0,095	0,140	1,47
	III	0,900	0,160	0,18
	<b>Rerata</b>			<b>0,98</b>

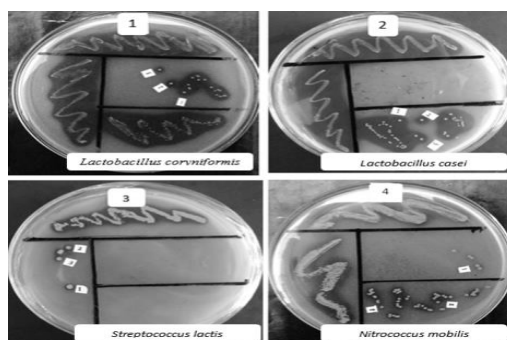
**Tabel 4. Hasil penghitungan indeks zona bening asam laktat**

No	Nama Bakteri	Ulangan	Dia-meter Koloni	Dia-meter Zona Bening	Indeks Zona Bening Asam Laktat
1	<i>Lactobacillus casei</i>	I	0.135	0.565	4.19
		II	0.125	0.510	4.08
		III	0.145	0.525	3.62
		<b>Rerata</b>			<b>3.96</b>
2	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	I	0.120	0.415	3.46
		II	0.125	0.420	3.36
		III	0.1	0.310	3.1
		<b>Rerata</b>			<b>3.31</b>
3	<i>Streptococcus lactis</i>	I	0.250	0.370	1.48
		II	0.225	0.355	1.58
		III	0.220	0.340	1.55
		<b>Rerata</b>			<b>1.54</b>
4	<i>Nitrococcus mobilis</i>	I	0.135	0.220	1.63
		II	0.175	0.265	1.51
		III	0.190	0.270	1.42
		<b>Rerata</b>			<b>1.52</b>



**Gambar 3.** Pengukuran Indeks Hidrolisis Lemak pada spesies bakteri lipolitik *Lactobacillus coryniformis*. (a) diameter koloni bakteri dan (b) diameter zona bening kemudian diukur, sehingga indeks hidrolisis lemak tiap spesies bakteri dapat dihitung (Sumber: Dokumen pribadi, 2017).

Berdasarkan penghitungan indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat, diketahui bahwa bakteri *Lactobacillus casei* memiliki indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat tertinggi yaitu sebesar 1,94 dan 3,96, kemudian *Lactobacillus coryniformis* memiliki indeks hidrolisis lemak sebesar 1,63 dan indeks zona bening asam laktat sebesar 3,31. *Streptococcus lactis* memiliki indeks hidrolisis lemak sebesar 1,51 dan indeks zona bening asam laktat sebesar 1,54. Apabila dibandingkan dengan ketiga bakteri tersebut, *Nitrococcus mobilis* memiliki indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat terendah yaitu 0,98 dan 1,52.



**Gambar 4.** Hasil penentuan indeks zona bening asam laktat dengan metode kuadran.

Keterangan: Bakteri diinokulasikan pada media MRSA yang mengandung  $\text{CaCO}_3$  0.5% (Sumber: Dokumen Pribadi, 2017).

Hasil penghitungan indeks hidrolisis lemak pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian dari Castillo *et al.* (1999). Pada hasil penelitiannya disebutkan bahwa aktivitas lipase pada bakteri golongan *Lactobacillus* cenderung lebih besar bila dibandingkan dengan bakteri lain seperti golongan *Lactococcus*, *Bacillus* dan *Streptococcus*.

Bakteri lipolitik mampu menghasilkan enzim lipase ekstraseluler yang dapat menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Lemak atau trigliserida merupakan molekul dengan rantai karbon yang panjang dapat dipecah menjadi asam lemak dan gliserol yang memiliki rantai karbon pendek ( $\text{C}_8$  sampai  $\text{C}_{18}$ ) melalui bantuan enzim lipase (White, 2009). Haba *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa trigliserida seperti lemak atau minyak lebih sulit dicerna oleh tubuh karena



memiliki rantai karbon yang panjang. Keberadaan bakteri lipolitik dalam wadi akan mampu meningkatkan daya cerna lemak yang terdapat pada wadi.

Proses pencernaan lemak di dalam tubuh akan lebih mudah, karena lemak yang terkandung di dalam wadi sudah terhidrolisis menjadi asam lemak dan gliserol oleh bakteri lipolitik. Sesuai dengan pemikiran Enig (2001), yang menyatakan bahwa asam lemak lebih mudah dicerna dan diserap oleh usus karena ukuran molekulnya relatif lebih kecil sehingga asam lemak tersebut dapat langsung diserap oleh usus halus dan masuk ke dalam sistem peredaran darah menuju ke sel-sel dan selanjutnya mengalami metabolisme untuk memproduksi energi. Penguraian lemak menjadi asam lemak dan gliserol memberikan keuntungan lain bagi tubuh. Di samping itu, pembentukan asam lemak berperan besar dalam pembentukan aroma dan cita rasa khas wadi. Berdasarkan hal tersebut, lemak khususnya asam lemak, yang merupakan salah satu komponen nutrisi penting bagi tubuh manusia akan mudah dicerna melalui konsumsi wadi.

Susanto dan Fahmi (2012) menambahkan bahwa lemak atau minyak dalam ikan yang terdegradasi dapat membentuk asam lemak tak jenuh *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) dan *Docosaexanoic Acid* (DHA) yang dapat menurunkan jumlah *very low-density lipoprotein* (VLDLs) di dalam darah. Dengan kata lain, adanya proses degradasi lemak menjadi asam lemak dan gliserol dapat berpotensi menjadi pencegah hipertensi bagi tubuh manusia.

Kemampuan setiap BAL dalam menghasilkan asam laktat memiliki perbedaan. Besar kecilnya kemampuan tersebut dapat diketahui berdasarkan hasil pengukuran nilai Indeks Zona Bening Asam Laktat yang dihasilkan oleh BAL tersebut. Semakin besar nilai Indeks Zona Bening Asam Laktat yang terbentuk, maka semakin besar kemampuan sel bakteri tersebut dalam memfermentasikan karbohidrat menjadi asam laktat (Melliawati *et al.*, 2015).

Hasil positif BAL diketahui berdasarkan terbentuknya zona bening yang terdapat di sekitar koloni bakteri (Khunajakr, 2008). Zona bening dapat terbentuk di sekitar koloni BAL disebabkan oleh adanya reaksi antara asam laktat yang dihasilkan BAL dengan  $\text{CaCO}_3$  yang terkandung dalam media pertumbuhan. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL akan bereaksi dengan basa  $\text{CaCO}_3$  dan menghasilkan produk garam kalsium baru, yaitu Ca-laktat. Ca-laktat tersebut memiliki sifat tidak berwarna dan larut dalam media MRSA, sehingga menimbulkan adanya zona bening disekitar koloni BAL (Fatmawati dkk., 2015; Nudyanto dan Zubaidah, 2015; Suryani dkk., 2015).

*Lactobacillus casei* merupakan bakteri lipolitik yang memiliki kemampuan menghidrolisis lemak tertinggi dan juga merupakan BAL yang menghasilkan asam laktat tertinggi pada wadi. Kemampuan bakteri tersebut dalam menghidrolisis lemak tertinggi dapat dipengaruhi oleh besarnya kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim lipase. Berdasarkan atas penemuan beberapa bakteri pendegradasi lemak dalam wadi maka dapat dilakukan kajian lebih lanjut mengenai bakteri penghasil enzim lipase. Isolasi bakteri penghasil enzim lipase ekstraseluler mulai banyak mendapatkan perhatian karena fungsinya yang luas dalam bidang pangan, industri dan bioteknologi (Lee *et al.*, 2015). Meskipun lipase dapat diperoleh dari tumbuhan dan hewan, lipase yang dihasilkan oleh mikroba memiliki keunggulan, yaitu: produksi yang tinggi, biaya produksi rendah, aktivitas katalitik beragam, stabilitas yang tinggi dan spesifitas yang luas (Muharni dkk, 2015).

Kemampuan *Lactobacillus casei* dalam menghasilkan asam laktat tertinggi disebabkan oleh kemampuan spesies tersebut dalam memfermentasikan karbohidrat menjadi asam laktat lebih besar jika dibandingkan dengan yang lainnya. *Lactobacillus casei* merupakan salah satu spesies BAL yang memiliki tingkat adaptasi tinggi pada lingkungannya, sehingga perubahan lingkungan tidak memengaruhi produksi asam laktat (Gunduz, 2005).

Bakteri Asam Laktat memiliki peranan penting dalam makanan fermentasi (Duhan *et al.*, 2013; Hwanhlem *et al.*, 2011; Patel and Parikh, 2016) dan tergolong bakteri yang aman dalam makanan (Duhan *et al.*, 2013; Khunajakr, 2008). BAL dapat mempengaruhi organoleptik dan ketahanan simpan makanan tersebut (Duhan *et al.*, 2013; Kongo, 2013).

BAL mempengaruhi keasaman produk secara cepat dari bahan baku melalui produksi asam organik, terutama asam laktat. BAL juga dapat menghasilkan bakteriosin yang mampu

menghambat berbagai mikroorganisme di lingkungan produk, sehingga berperan sebagai antimikroba untuk mencegah pertumbuhan bakteri kontaminan yang dapat merusak makanan, dan dapat menjaga keamanan makanan (Duhan *et al.*, 2013). BAL tersebut akan menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH wadi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, pH awal dari wadi berkisar antara 6.0-6.5 dan setelah difermentasi selama 22 x 24 jam, pH akhir wadi menurun hingga pH 5. Penurunan pH tersebut diakibatkan oleh asam laktat yang dihasilkan oleh BAL dan terakumulasi di dalam wadi, sehingga menyebabkan pH wadi menurun (semakin masam). Selain itu, BAL juga bermanfaat sebagai bakteri probiotik. BAL yang digunakan sebagai bakteri probiotik pada produk makanan atau minuman dapat membantu proses pencernaan makanan serta menjaga kesehatan sistem pencernaan (Sofyan *et al.*, 2013).

## Kesimpulan

Beberapa kesimpulan yang dapat diambil setelah dilakukan penelitian ini, meliputi: Spesies bakteri lipolitik dan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang ditemukan pada wadi ikan patin adalah *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, dan *Nitrococcus mobilis*. Keempat spesies bakteri tersebut mempunyai indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat yang berbeda satu sama lain, yaitu: *Lactobacillus coryniformis* memiliki indeks hidrolisis lemak sebesar 1.63 dan indeks zona bening asam laktat sebesar 3.31; *Lactobacillus casei* sebesar 1.94 dan 3.96; *Streptococcus lactis* sebesar 1.51 dan 1.54 serta *Nitrococcus mobilis* sebesar 0.98 dan 1.52. *Lactobacillus casei* memiliki kemampuan tertinggi dalam menghasilkan asam laktat berdasarkan hasil pengukuran Indeks Zona Bening Asam Laktat. *Lactobacillus casei* merupakan spesies bakteri lipolitik dan BAL yang memiliki kemampuan menghidrolisis lemak dan menghasilkan asam laktat tertinggi berdasarkan indeks hidrolisis lemak dan indeks zona bening asam laktat, yaitu sebesar 1.94 dan 3.96.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Ibu Prof. Dr. Utami Sri Hastuti dan ibu Sitoresmi Prabaningtyas, M.Si yang telah membimbing dalam proses penelitian, ucapan terima kasih juga diberikan kepada ibu Indah Sari Dewi, M.Pd yang telah memberikan izin kepada kami untuk melanjutkan penelitian yang telah dilakukan.

## Referensi

- Bestari, Candra, N & Suharjono. (2015). Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi. *Jurnal Biotropika*, 3 (3).
- Castillo, I., Requena, T., Palencia, P.F.D., Fontecha, J., & Gobbetti, M. (1999). Isolation and Characterization of an Intracellular Esterase from *Lactobacillus casei* subs. *casei* IFPL731. *Journal of Applied Microbiology*, (86), 653-659.
- Desniar, Setyaningsih, I., & Sumardi, R.S. (2015). Perubahan Parameter Kimia dan Mikrobiologi serta Isolasi Bakteri Penghasil Asam Selama Fermentasi Bekasam Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 15 (3), 232-239.
- Dewi, I.S., Hastuti, U.S., Lestari, U., & Suwono, H. (2015). Wadi: A Traditional Food of Dayak Ethnic At Central Borneo As An Effort of Food Warranty Based on The Local Wisdom. *Proceeding International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC)*.
- Duhan, J.S., Nehra, K., Gahlawat, S.K., Saharan, P., & Surkha, D. (2013). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology: Prospects and Applications Springer*, 1(10), 127-141.

- Enig, M. G. (2001). *Coconut: In Support of Good Health in The 21 Century*. Online: [http://www.coconutoil.com/coconut\\_oil\\_21st\\_century.html](http://www.coconutoil.com/coconut_oil_21st_century.html).
- Fatmawati, N., Hafsan, & Wahdiniar, A. (2015). Isolasi Bakteri Asam Laktat Berpotensi Probiotik pada Dangke, Makanan Tradisional dari Susu Kerbau di Curio Kabupaten Enrekang. *Jurnal Ilmiah Biologi Biogenesis*, 3(1):60-65.
- Gunduz, M. (2005). *Lactic Acid Production by Lactobacillus casei Nrrl B-441 Immobilized in Chitosan Stabilized Ca-Alginate Beads*. Unpublished thesis, Izmir Institute of Technology.
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marquez, A., Busquets, M., & Manresa, A. (2000). Isolation of Lipase-Secreting Bacteria by Deploying Used Frying Oil as Selective Substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 40-44 CrossRef.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., & Maneera, S. (2011). Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Thai Traditional Fermented Fish (Plasom) and Production of Plasom from Selected Strains. *Food Control*, 22, 401-407.
- Khairina, R. (1998). *Perubahan Sifat-sifat Kimiawi, Fisikawi, Mikrobiologi dan Sensoris Produk Wadi Ikan Betok (Anabas testudineus Block)*. Unpublished thesis, Universitas Gajah Mada.
- Khairina, R., & Khotimah, K. (2006). Studi Komposisi Asam Amino dan Mikroflora pada Wadi Ikan Betok. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 7 (2),120-126.
- Khunajakr, N., Wongwicharn, A., Moonmangmee, D., & Tantipaiboonvut, S. (2008). Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds from Pig Gastrointestinal Tracts. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, *Journal Science Technology*, 8 (1), 8-17.
- Kongo, M. (2013). *Lactic Acid Bacteria for Food, Health and Livestock Purposes*. Croatia: Dragana Manestar.
- Kordi, M.G.H. (2010). *Budidaya Ikan Patin Di Kolam Terpal*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath S.C.B., LakshmiPriya, T., & Tang, T.H. (2015). Lipase-Secreting Bacillus Species in an Oil-Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. *BioMed Research International*.
- Mahyuddin, K. (2010). *Panduan Lengkap Agribisnis Patin*. Depok: Penebar Swadaya.
- Masood, M.I., Qadir, M.I., Shirazi, J.H., & Khan, I.U. (2011). Beneficial Effects of Lactic Acid Bacteria on Human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91-98.
- Melliawati, R., Djohan, A.C., & Yopi. (2015). Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Penghasil Enzim Protease. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1 (2), 184-188.
- Muharni, Yohandini, H., & Anggraini, M. (2015). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termolipolitik dengan Pendekatan Biologi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA. *Prosiding Semirata 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat*, 95-104.

- Nudyanto, A. & Zubaidah, E. (2015). Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, (3) 2, 743-748.
- Patel, S.A & Parikh, S. C. (2016). Production of Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus* sp. Isolated from Local Dairy Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5 (5), 734-741.
- Rajan, A., Kumar, D.R.S., & Nair., A.J. (2011). Isolation of a Novel Alkaline Lipase Producing Fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from Aged and Crude Rice Bran Oil and Quantification by HPTLC. *International Journal of Biological Chemistry*, 5 (2), 116-126.
- Reddy, G., Altaf, M.D., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., & Kumar, E.V. (2008). Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation, A Review. *Biotechnology Advances*, 26, 22–34.
- Restu. (2013). Daya Awet Wadi Ikan Toman (*Channa micropeltes*) Setelah Proses Fermentasi. *Jurnal Ilmu Hewani Tropika*, 2 (1), 31-34.
- Sofyan, A., Aswari, A.N., Purwoko, T., & Damayanti, E. (2013). Screening of Lactic Acid Bacteria from Rumen Liquor and King Grass Silage as well as Their Antibacterial Activities. *Media Peternakan*, 216-223.
- Suryani, Dharmaa, A., Ariefa, S., Manjanga, Y., & Nasira, N. (2015). Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Santan Kelapa Menggunakan Media Selektif. *Jurnal Sains dan Informatika*, 1, 30-36.
- Susanto, E dan Fahmi, A. S. (2011). Senyawa Fungsional dari Ikan: Aplikasinya dalam Pangan. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1 (4).
- White, B. (2009). Dietary Fatty Acids. *Am Fam Physician* (80), 345-72.
- Widyawati, P.S., Wijaya, C.H., Harjosworo, P.S., & Sajuthi, D. (2010). Pengaruh Ekstraksi dan Fraksinasi Terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH (1,1-difenil-2-Pikrihidrazil) Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less). *Rekayasa Kimia dan Proses*. Semarang: Universitas Diponegoro.

<b>Mirza Yanuar Rizky</b>	Universitas Negeri Malang (UM), Jalan Semarang No. 5, Malang, Indonesia E-mail: <a href="mailto:mrzyanuar@gmail.com">mrzyanuar@gmail.com</a>
<b>Rizka Diah Fitri</b>	Universitas Negeri Malang (UM), Jalan Semarang No. 5, Malang, Indonesia E-mail: <a href="mailto:mrzyanuar@gmail.com">mrzyanuar@gmail.com</a>
<b>Utami Sri Hastuti</b>	Prof. Dr, Dosen, Universitas Negeri Malang (UM), Jalan Semarang No. 5, Malang, Indonesia E-mail: <a href="mailto:mrzyanuar@gmail.com">mrzyanuar@gmail.com</a>
<b>Sitoresmi Prabaningtyas</b>	M.Si, Dosen, Universitas Negeri Malang (UM), Jalan Semarang No. 5, Malang, Indonesia E-mail: <a href="mailto:mrzyanuar@gmail.com">mrzyanuar@gmail.com</a>