

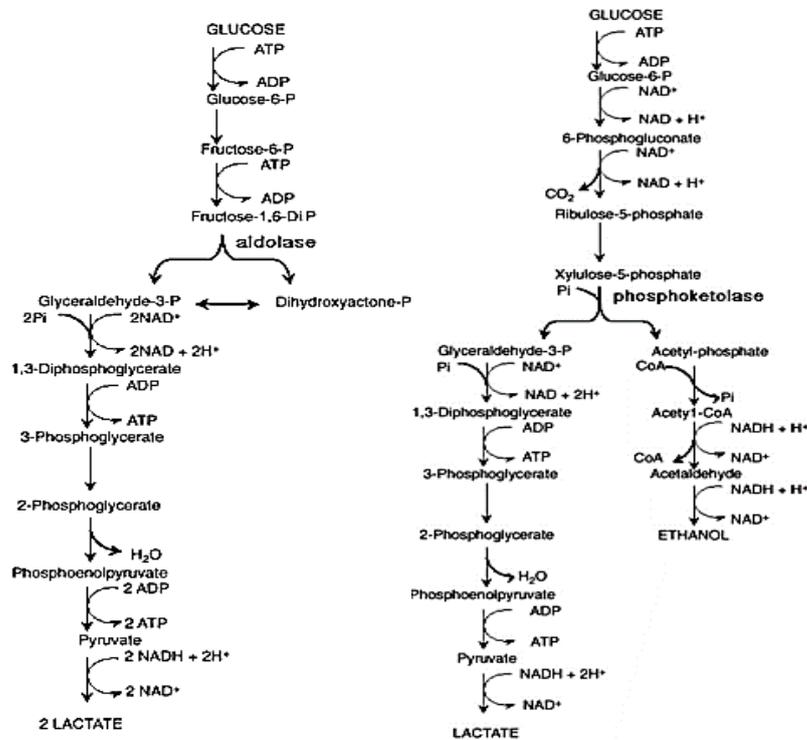
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fermentasi

Menurut Jay, *et al.*, (2005), fermentasi adalah proses perubahan kimiawi, dari senyawa karbohidrat menjadi asam organik, alkohol, dan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Proses fermentasi menyebabkan terjadinya penguraian senyawa-senyawa organik untuk menghasilkan energi serta terjadi pemecahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba. Fermentasi terjadi karena adanya aktivitas suatu mikroorganisme terhadap substrat yang sesuai sebagai media pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Fermentasi memanfaatkan kemampuan mikroorganisme untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Proses fermentasi dimulai dari jalur glikolisis yang menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat akan dikatalisis oleh enzim asam dehidrogenase dan direduksi NADH untuk menghasilkan ATP dan asam (Pelaez dan Orue 2010).

Fermentasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu spontan dan tidak spontan. Fermentasi spontan adalah yang tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi dalam proses pembuatannya. Sedangkan fermentasi tidak spontan adalah yang tidak ditambahkan starter atau ragi dalam proses pembuatannya. Mikroorganisme tumbuh dan berkembang secara aktif merubah bahan yang difermentasi menjadi produk yang diinginkan pada proses fermentasi. Fermentasi terbagi atas dua jenis, yakni homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya hanya berupa asam laktat. Contoh homofermentatif adalah proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan yoghurt. Heterofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya berupa asam laktat dan etanol sama banyak. Contoh heterofermentatif adalah proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan tape (Belitz, *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 (a) Jalur fermentasi homofermentif asam laktat (b) jalur fermentasi heterofermentif laktat, Sumber: Suroño (2004)

Makanan tradisional yang diproses melalui fermentasi, disebut dalam beberapa penelitian terbukti bahwa makanan fermentasi tidak hanya aman dikonsumsi tetapi juga berkhasiat bagi kesehatan. Hal ini disebabkan selama proses, beberapa senyawa anti gizi maupun yang bersifat racun bisa diturunkan atau dikonversi menjadi senyawa yang bermanfaat, sehingga makanan fermentasi menjadi aman dikonsumsi bahkan mempunyai senyawa spesifik yang berfungsi sebagai senyawa fungsional dan mengatur proses metabolisme senyawa lain sehingga proses pencernaan menjadi lebih lancar. Berbagai contoh makanan fermentasi seperti sayur asin (asinan sayur), bekasam dan sejenisnya (produk fermentasi bakteri asam laktat) (Masdarini, 2011).

Makanan fermentasi termasuk makanan tradisional, karena prosesnya merupakan warisan turun temurun hasil temuan nenek moyang. Di Indonesia,

ada beberapa makanan fermentasi yang bertarap nasional maupun menuju sosialisasi ke taraf nasional bahkan internasional, seperti tempe, tapai, teh hijau, sayur asin, bekasam dan lain-lain. Banyak orang menggemari makanan fermentasi, tetapi hanya sedikit yang menyadari bahwa makanan fermentasi memiliki keunggulan terutama dari segi manfaat (khasiat) dan keamanan bagi kesehatan (Masdarini, 2011).

2.2 Produk Fermentasi Lobak Putih Asin (*Rhaphanus sativus* L.)

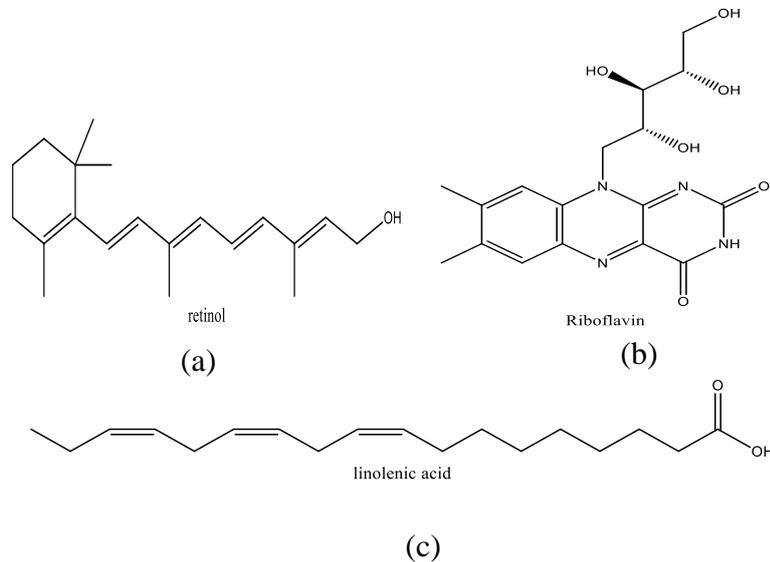
Asinan merupakan salah satu olahan sayuran dan buah-buahan yang dikonsumsi dalam keadaan mentah. Makanan ini merupakan hidangan sehat, kaya antimikroba dan antioksidan. Asinan juga mengandung zat penangkal kanker dan hipertensi, serta membuat awet muda dan bebas osteoporosis. Asinan sayuran merupakan sayuran yang diawetkan dengan jalan fermentasi asam (Safitri, 2015). Salah satu yang merupakan asinan sayur adalah lobak asin.



Gambar 2.2 Lobak Putih Asin (*Rhaphanus sativus* L.)

Lobak (*Rhaphanus sativus* L.) merupakan sayuran berumbi yang berasal dari Cina dan Jepang. Umbi berbentuk bulat panjang dan berwarna putih serta merupakan bagian utama untuk dikonsumsi, hampir seluruh bagian lobak seperti daun dan bunganya dapat dikonsumsi. Lobak memiliki aroma yang kuat, kandungan gula pada lobak yaitu 1,9 g dan mengandung berbagai vitamin yang bermanfaat bagi tubuh manusia yaitu vitamin A, B1, B2, C, E, beta-carotene, serat

(*fiber*), dan minyak omega-3 yang tinggi . Struktur senyawa vitamin A, Vitamin B2 dan Omega-3 dapat dilihat pada Gambar 2.3 di bawah ini.



Gambar 2.3 Struktur (a) Vitamin A, (b) Vitamin B2, (c) Omega-3

Fermentasi yang digunakan pada pembuatan lobak asin yaitu, fermentasi spontan dengan kondisi anaerob, fermentasi spontan adalah fermentasi bahan pangan dimana dalam pembuatannya tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, tetapi mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang baik secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhannya, dimana aktivitas dan pertumbuhan bakteri asam laktat dirangsang karena adanya garam. Garam memegang peranan penting dalam fermentasi pickel. Garam menarik keluar air dari buah yang mengandung padatan terlarut seperti protein, karbohidrat, mineral, dan vitamin. Garam menghambat bakteri proteolitik, dan menstimulir tumbuhnya bakteri asam laktat. Jumlah dan jenis bakteri yang tumbuh tergantung dari konsentrasi garam. Garam digunakan dalam proses fermentasi disamping berfungsi untuk meningkatkan cita rasa, juga berperan sebagai pembentuk tekstur dan mengontrol pertumbuhan mikroorganisme yang diinginkan dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk (Majid,*et al.*, 2014).

2.3 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk batang atau bulat, tidak membentuk spora, fermentasi fakultatif *anaerob*, tidak mempunyai *sitokrom*, tidak memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat dan memanfaatkan laktat, oksidasi negatif, katalase negatif, motilitas negatif dan kemampuan memfermentasi glukosa menjadi asam laktat (Carr, *et al.*, 2002). Bakteri Asam Laktat berperan penting dalam menghasilkan produk fermentasi berbasis susu (yogurt, kefir, susu asam, keju, dadih, dan sebagainya), daging (sosis fermentasi, urutan, dan sebagainya), buah dan sayuran (tempoyak, sauerkraut, pikel, dan sebagainya), serta minuman. Pada proses fermentasi, terjadi proses pengasaman yang cepat pada bahan mentah oleh BAL yaitu dengan menghasilkan asam organik terutama asam laktat. Produk penting lainnya adalah asam asetat, etanol, senyawa-senyawa tersebut, BAL dapat meningkatkan masa simpan dan *safety*, memperbaiki tekstur dan berkontribusi terhadap sensori produk fermentasi (De Vuyst dan Leroy, 2007).

Axelsson dan Salminen (2004) menggolongkan BAL ke dalam 12 genus yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*. Sedangkan klasifikasi terbaru menggolongkan BAL ke dalam 17 genus yaitu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella*. Genus lainnya yaitu *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* dan *Bifidobacterium* (Carr, *et al.*, 2002). Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa termasuk didalam kelompok bakteri asam laktat bersifathomofermentatif, sedangkan Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbon dioksida dikenal dalam kelompok Bakteri asam laktat bersifat heterofermentatif (Reddy, *et al.*, 2008)

Nama bakteri asam laktat diperoleh dari kemampuannya dalam memfermentasi gula menjadi asam laktat. Bakteri asam laktat juga terdapat dalam

tubuh manusia sebagai flora normal tumbuh (Prescott,*et al.*,1997). Bakteri juga dapat ditemukan di produk sayuran dan susu. Berikut ini sumber-sumber bakteri yang berasal dari produk sayuran, produk susu, sistem pencernaan manusia, dan vagina manusia yang dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Sumber Bakteri Asam Laktat

Sampel	Kelompok Bakteri	Aktivitas atau produk
Produk Sayuran	<i>Streptococcus spp</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ,	Pikel, sauerkraut
Produk susu	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Leuconostoc mesentroides</i> <i>Lactobacillus lactis</i>	Keju, susu, yoghurt
Sistem pencernaan (oral dan usus)	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S. mutans</i> , dan <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Flora normal, dental caries
Vagina mamalia	<i>Streptococcus spp</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>	Patogen pada saluran urin Flora normal

BAL dapat berfungsi sebagai pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungannya dan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti hidrogen peroksida, diasetil asetaldehid, reuterin dan bakteriosin (Kusmiati dan Malik, 2002). Sejauh ini telah diketahui bahwa keberadaan bakteri asam laktat tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan sehingga sering digunakan dalam industri pengawetan makanan, minuman dan berpotensi sebagai produk probiotik.

Beberapa kriteria penting untuk karakter fisiologi yang merupakan seleksi kelayakan bakteri sebagai produk probiotik antara lain uji pertumbuhan/resistensi bakteri probiotik pada pH rendah (Hardiningsih,*et al.*, 2006).

2.4 Senyawa Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa kimia yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Umumnya hampir semua senyawa yang diproduksi oleh BAL mampu menghambat pertumbuhan BAL lainnya dan beberapa di antaranya memiliki efek bakterisidal terhadap bakteri lain yaitu bakteri pembusuk dan patogenik asal makanan seperti *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Clostridium botulinum*. Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa-senyawa tertentu selain asam laktat dan asam asetat (asam organik) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya H₂O, diasetil dan bakteriosin dalam jumlah yang relatif sedikit dibandingkan dengan produksi asam organik (Kusmiati dan Malik, 2002).

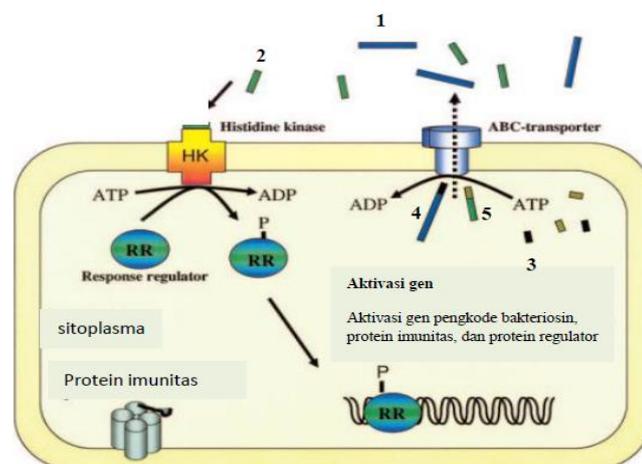
Kemampuan suatu senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, jumlah mikroba, suhu, spesies mikroba, adanya senyawa organik dan keasaman pH. Mekanisme aktivitas penghambatan antimikroba menurut Davidson dan Brannen (1993) dapat melalui beberapa faktor, antara lain: (1) menghambat metabolisme sel (2) menghambat sintesis protein (3) menghambat sintesis dinding sel (4) menghambat permeabilitas membran sel (5) merusak asam nukleat dan protein. Sifat-sifat antimikroba antara lain yaitu menghambat dan membunuh mikroba patogen tanpa merusak inangnya, bersifat bakterisida bukan bakteriostatik, tidak menyebabkan resistensi pada kuman atau mikroba, berspektrum luas, tidak menimbulkan alergenik, zat

antimikroba tetap aktif dalam plasma atau cairan tubuh, dan zat antimikroba dapat larut dalam air dan stabil (Pelezar dan Chan, 1986).

2.4.1 Bakteriosin

Banyak bakteri dengan taksonomi yang berbeda dan berada di berbagai habitat, menghasilkan antibakteri. Senyawa bakteri yang aktif menghambat bakteri lain. Baik bakteri Gram negatif maupun bakteri Gram positif dapat menghasilkan bakteriosin. BAL diketahui sebagai salah satu jenis bakteri penghasil bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang dikeluarkan oleh bakteri yang memiliki sifat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya terutama yang memiliki kekerabatan secara filogenik. Protein ini mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan hewan (Davidson dan Brannen, 1993)

Bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat mudah diterima sebagai bahan tambahan dalam makanan baik oleh ahli kesehatan maupun konsumen karena secara alami bakteri ini berperan dalam fermentasi. Bakteriosin bermanfaat bagi nutrisi makanan, terutama pada industri makanan karena bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL sangat potensial digunakan sebagai pengawet makanan serta dapat menggantikan pengawet makanan yang terbuat dari senyawa kimia. Keuntungan menggunakan bakteriosin sebagai senyawa antibakteri adalah tidak mengandung toksik, mudah didegradasi, tidak membahayakan mikrob usus, dan mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan (Kusmiati dan Malik, 2002).



Gambar 2.4 Mekanisme sintesis bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL (Drider, *et al.*, 2006). (RR) respon regulator, (P) peptida, 1 bakteriosin; 2 peptida penginduksi; 3 leader peptida; 4 pre-bakteriosin dan 5 pre peptida penginduksi

2.4.2 Klasifikasi Bakteriosin

Penggolongan bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL menurut Ouwehand dan Vesterlund (2004) antara lain yaitu Kelas I (Lantibiotik), kelas II, kelas III, dan kelas IV. Bakteriosin kelas I dinamakan lantibiotik, peptida kecil (<5 kDa). Lantibiotik mengandung asam amino yang secara alami tidak ada di alam (seperti: lantionin dan *β -metil* lantionin) dengan penambahan sejumlah asam amino terdehidrasi. Asam amino tidak biasa ini disintesis melalui modifikasi setelah translasi. Contoh lantibiotik adalah nisin A, nisin Z, Lacticin 481, Lactocin S dan lain-lain. Bakteriosin kelas II juga kecil (<10 kDa), pada umumnya stabil terhadap panas, tidak mengandung lantionin, dan merupakan peptida aktif membran. Kelompok kedua ini dibagi lagi dalam tiga sub kelas. Kelas IIa merupakan kelompok terbesar yang mempunyai peptide *listeria-active* dengan sekumpulan sekuen amino-terminal. Kelas IIb adalah bakteriosin dengan dua peptida. Kelas IIc adalah bakteriosin teraktifasi-tiol. Bakteriosin kelas III berukuran besar (<30 kDa) dan tidak tahan panas. Bakteriosin kelas III yang sudah diisolasi hanya berasal dari genus *Lactobacillus*. Bakteriosin yang di kelompokkan dalam kelas ini tidak terlalu banyak karena sedikitnya pengetahuan tentang jenis ini. Bakteriosin kelas IV merupakan kompleks dengan karbohidrat atau lipida. Informasi tentang bakteriosin ini sangat terbatas.

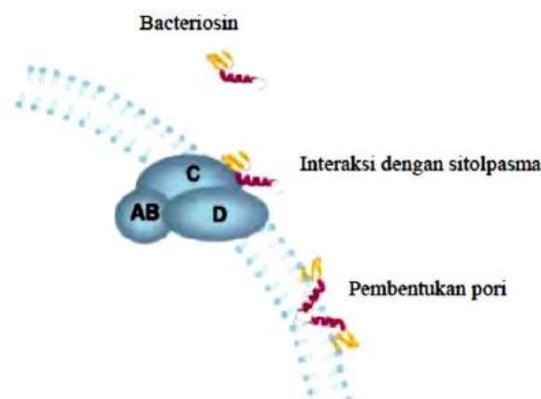
2.4.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Bakteriosin

Berbagai faktor dapat mempengaruhi suatu bakteri dalam menghasilkan bakteriosin. Nutrisi, pH media dan suhu adalah faktor kritis suatu bakteri dalam menghasilkan senyawa bakteriosin. Selain itu, setiap bakteri menghasilkan bakteriosin pada fase pertumbuhan tertentu (fase logaritmik atau fase stasioner) sehingga waktu inkubasinya berbeda satu sama lain. Suhu inkubasi cawan juga dapat mempengaruhi aktivitas bakteriosin dalam menghambat bakteri uji. Produksi bakteriosin pada BAL berkaitan dengan pertumbuhannya: produksi

bakteriosin biasanya terjadi sepanjang fase pertumbuhan dan berhenti pada akhir fase eksponensial (kadang-kadang sebelum akhir fase eksponensial). Aktivitas bakteriosin *L. plantarum* N014 tidak terdeteksi sampai kultur *L. plantarum* N014 memasuki fase eksponensial dan aktivitas bakteriosin mencapai maksimum pada awal fase stasioner. Setelah mencapai level tertinggi, aktivitas bakteriosin menurun dengan cepat. Berbeda dengan *L. plantarum* N014, bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* memiliki aktivitas maksimum pada akhir fase stasioner. Produksi senyawa mirip bakteriosin oleh *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 dimulai pada fase eksponensial dan mencapai maksimum selama fase stasioner (Diop,*et al.*, 2007).

2.4.4 Mekanisme Kerja Bakteriosin

Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL bersifat bakterisidal terhadap sel sensitif dan dapat mengalami kematian dengan sangat cepat pada konsentrasi rendah. Beberapa bakteriosin mempunyai sifat bakterisidal melawan beberapa galur dan spesies yang berelasi dekat, tetapi beberapa dapat efektif melawan banyak galur dalam spesies dan genus yang berbeda. Sel penghasil bakteriosin mengalami ketahanan terhadap bakteriosin yang dihasilkannya sendiri, karena memperoleh ketahanan protein yang spesifik (Drider,*et al.*, 2006). Mekanisme kerja bakteriosin adalah sebagai berikut:



Gambar 2.5 Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri target (Drider,*et al.*, 2006)

Mekanisme kerja bakteriosin dipengaruhi oleh konsentrasi bakteriosin,

kemampuan ionisasi, suhu, pH dan fase pertumbuhan sel target. Spektrum antimikroba didefinisikan sebagai satuan galur yang sensitif terhadap 9 bakteriosin yang diberikan. Sensitivitas ini bergantung pada dua tahap pada model *in vivo*. Tahap pertama, bakteriosin berinteraksi dengan struktur permukaan sel, seperti membran atau molekul reseptor. Tahap kedua, bakteriosin membuat permeabel membran melalui pembentukan lubang. Pengikatan awal dipengaruhi oleh komposisi membran, muatan membran dan adanya struktur molekul target (reseptor). Tahap kedua dipengaruhi oleh komposisi membran, struktur C terminal pada bagian membran yang permeabel dan adanya protein imunitas dari bakteri penghasil (De Vuyst dan Leory, 2007). Mekanisme kerja bakteriosin yaitu molekul bakteriosin melakukan kontak langsung dengan membran sel, akibatnya potensial membran terganggu dan merusak permeabilitas membran sel mikrob dengan membentuk pori pada sel mikrob melalui proses gangguan terhadap PMF (*Proton Motive Force*) sehingga akan mengalami kebocoran. Kebocoran tersebut menyebabkan terganggunya kestabilan membran sel sehingga pertumbuhan sel mikrob terhambat dan akhirnya mengalami kematian (Gambar 3) (Drider, *et al.*, 2006).