

**LAPORAN
PENELITIAN DASAR KEILMUAN (PDK)**



**SKRINING ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ASAM
LAKTAT DARI FERMENTASI BUAH KAKAO MERAH (THEOBROMA CACAO
L.VARIETAS CRIOLLO) TERHADAP BAKTERI SHIGELLA DYSENTERIAE**

Tim Pengusul

Fitri Yuniarti, M.Si. (0318068504)

Dra. Fitriani, M. Si (0027026401)

**PROGRAM STUDI S1-FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
TAHUN 2020**

**LEMBAR PENGESAHAN
PENELITIAN DASAR KEILMUAN (PDK)**

Judul Penelitian

Skrining Antibakteri Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Buah Kakao Merah (*Theobroma cacao* L. varietas criollo) Terhadap Bakteri *Shigella Dysenteriae*

Jenis Penelitian : PENELITIAN DASAR KEILMUAN (PDK)
Ketua Peneliti : Fitri Yuniarti, M. Si
Link Profil simakip : <http://simakip.uhamka.ac.id/pengguna/show/690>
Contoh link: <http://simakip.uhamka.ac.id/pengguna/show/978>
Fakultas : **Fakultas Farmasi dan Sains**
Anggota Peneliti : Dra, Fitriani, M. Si
Link Profil simakip : <http://simakip.uhamka.ac.id/pengguna/show/687>
Contoh link: <http://simakip.uhamka.ac.id/pengguna/show/978>
Anggota Peneliti :-
Link Profil simakip :-
Contoh link: <http://simakip.uhamka.ac.id/pengguna/show/978>
Waktu Penelitian : 6 Bulan
Luaran Penelitian :
Luaran Wajib : Jurnal Alkauniyah-Jurnal Nasional Terakreditasi Sinta 2
Status Luaran Wajib : **In Review**
Luaran Tambahan : Prosiding Seminar Nasional
Status Luaran Tambahan: Submitted

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Kori Yati, M.Farm., Apt
NIDN. 0324067802

Menyetujui,
Dekan Fakultas Farmasi dan Sains

Dr. Hadi Sunaryo, M.Si., Apt
NIDN.0325067201

Jakarta, 29 November 2020
Ketua Peneliti



Fitri Yuniarti, M.Si
NIDN.0318068504

Ketua Lemlitbang UHAMKA

Prof. Dr. Suswandari, M.Pd
NIDN. 0020116601



UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

Jln. Tanah Merdeka, Pasar Rebo, Jakarta Timur
Telp. 021-8416624, 87781809; Fax. 87781809

**SURAT PERJANJIAN KONTRAK KERJA PENELITIAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA**

Nomor : 295 / F.03.07 / 2020
Tanggal : 12 Juni 2020

Bismillahirrahmanirrahim

Pada hari ini, Jum'at, tanggal Dua Belas, bulan Juni, Tahun Dua Ribu Dua Puluh, yang bertanda tangan di bawah ini **Prof. Dr. Hj Suswandari, M.Pd**, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, selanjutnya disebut sebagai **PIHAK PERTAMA**; **FITRI YUNIARTI S.SI., M.SI**, selanjutnya disebut sebagai **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA sepakat untuk mengadakan Perjanjian Kontrak Kerja Penelitian yang didanai oleh RAPB Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

Pasal 1

PIHAK KEDUA akan melaksanakan kegiatan penelitian dengan judul : **SKRINING ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI BUAH KAKAO MERAH (THEOBROMA CACAO L.VARIETAS CRIOLLO) TERHADAP BAKTERI SHIGELLA DYSENTERIAE** dengan luaran wajib dan luaran tambahan sesuai data usulan penelitian Bacth 2 Tahun 2019 melalui simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 2

Bukti luaran penelitian wajib dan tambahan harus sesuai sebagaimana yang dijanjikan dalam Pasal 1. Luaran penelitian yang dimaksud dilampirkan pada saat Monitoring Evaluasi dan laporan penelitian yang diunggah melalui simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 3

Kegiatan tersebut dalam Pasal 1 akan dilaksanakan oleh PIHAK KEDUA mulai tanggal 12 Juni 2020 dan selesai pada tanggal 12 November 2020.

Pasal 4

Berdasarkan kemampuan keuangan lembaga, PIHAK PERTAMA menyediakan dana sebesar Rp.10.000.000,- (Terbilang : *Sepuluh Juta*) kepada PIHAK KEDUA untuk melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1. Sumber biaya yang dimaksud berasal dari RAB pada Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Tahun Anggaran 2019/2020.

Pasal 5

Pembayaran dana tersebut dalam Pasal 4 akan dilakukan dalam 2 (dua) termin sebagai berikut;
(1) Termin I 70 % : Sebesar 7.000.000 (Terbilang: *Tujuh Juta Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA menyerahkan proposal penelitian yang telah direview dan diperbaiki sesuai saran reviewer pada kegiatan tersebut Pasal 1.

(2) Termin II 30 % : Sebesar 3.000.000 (Terbilang: *Tiga Juta Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA mengunggah laporan akhir penelitian dengan melampirkan bukti luaran penelitian wajib dan tambahan sesuai Pasal 1 ke simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 6

(1) PIHAK KEDUA wajib melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1 dalam waktu yang ditentukan dalam Pasal 3.

(2) PIHAK PERTAMA akan melakukan monitoring dan evaluasi pelaksanaan kegiatan tersebut sebagaimana yang disebutkan dalam Pasal 1. Bila PIHAK KEDUA tidak mengikuti Monitoring dan Evaluasi sesuai dengan jadwal yang ditentukan, tidak bisa melanjutkan penyelesaian penelitian dan harus mengikuti proses Monitoring dan Evaluasi pada periode berikutnya.

(3) PIHAK PERTAMA akan mendenda PIHAK KEDUA setiap hari keterlambatan penyerahan laporan hasil kegiatan sebesar 0,5 % (setengah persen) maksimal 20% (dua puluh persen) dari jumlah dana tersebut dalam Pasal 4.

(4) Dana Penelitian dikenakan Pajak Pertambahan Nilai (PPN) dari keseluruhan dana yang diterima oleh PIHAK PERTAMA sebesar 5 % (lima persen)

Jakarta, 12 Juni 2020

PIHAK PERTAMA
Lembaga Penelitian dan Pengembangan
Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA
Ketua,



Prof. Dr. Hj Suswandari, M.Pd

PIHAK KEDUA
Peneliti,



FITRI YUNIARTI S.SI., M.SI

Mengetahui
Wakil Rektor II UHAMKA



Dr. ZAMAH SARI M.Ag.

ABSTRAK

Cacao merupakan salah satu komoditas perkebunan dan Sumber Daya Alam Indonesia yang memiliki peranan cukup penting, terutama dalam pengembangan habitat tumbuhnya berbagai mikroorganisme baik, salah satunya Bakteri Asam Laktat (BAL) yang baik untuk kesehatan pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat dari fermentasi buah cacao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*), melakukan skrining antibakteri dan melakukan identifikasi gen 16S rRNA BAL yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini diawali dengan isolasi bakteri asam laktat dari fermentasi buah cacao merah, setelah itu dilakukan skrining aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap bakteri uji *Shigella dysenteriae*. Dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan primer 27F dan 1492R. Hasil amplifikasi disekuensing dan dilakukan penyejajaran data pada program BLAST. Hasil Penelitian menunjukkan bahwa isolat KAT372 memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi. Hasil sekuensing dan penyejajaran dengan BLAST didapatkan bahwa isolat KAT372 memiliki 99% kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa Isolat BAL dari fermentasi buah cacao merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*, sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibakteri alami.

Kata Kunci: Bakteri Asam Laktat, Cacao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*), Antibakteri, *Shigella dysenteriae*, PCR.

DAFTAR ISI

Halaman Pengesahan.....	ii
Surat Perjanjian Kontrak.....	iii
Abstrak.....	iv
Daftar Isi	vi
Bab 1. Pendahuluan	1
Bab 2. Tinjauan Pustaka	4
Bab 3. Metodologi Penelitian	11
Bab 4. Hasil dan Pembahasan.....	16
Bab 5. Simpulan dan Saran.....	26
Bab 6. Luaran Yang dicapai.....	27
Bab 7. Rencana Tindak Lanjut Dan Proyeksi Hilirisasi.....	28
Daftar Pustaka	29
Lampiran.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Identifikasi Morfologi BAL dari Kakao Merah.....	18
Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Asam Laktat Terhadap Bakteri <i>Shigellae dysenteriae</i>	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hasil Elektroforesis Amplifikasi DNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372.....	22
Gambar 2. Deskripsi Hasil <i>Nucleotide</i> BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372 Dari Fermentasi Buah Kakao.....	24

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan berbagai sumber daya alam, salah satunya berbagai jenis tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan yang memiliki peranan cukup penting, terutama memiliki keuntungan untuk pengembangan habitat tumbuhnya berbagai mikroorganisme baik, salah satunya bakteri asam laktat yang baik untuk kesehatan pencernaan. Bakteri asam laktat memberikan pengaruh yang menguntungkan terhadap mikroflora normal dalam usus, bersifat kompetitif terhadap bakteri patogen dan menstimulasi imunitas mukosa (Yani dkk. 2006). Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari yoghurt yang diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Semua isolat bakteri asam laktat yang didapat menghasilkan zona bening pada uji aktivitas antibakterinya (Yani dkk. 2006).

Penelitian tentang isolasi bakteri asam laktat untuk kesehatan telah banyak dilakukan terutama yang diisolasi dari produk-produk daging mentah ataupun kalengan dan produk susu. Namun masih sedikit yang diisolasi dari buah-buahan dan sayur-sayuran terutama buah-buahan lokal. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan sayuran seperti durian, nenas, sirsak, kakao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, dan kacang panjang merupakan sumber potensial bakteri asam laktat (Sari dkk. 2013). Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bakteri asam laktat adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) yang dibagi menjadi tiga kelompok besar yaitu, *criollo*, *forastero* dan *trinitario*.

Kakao jenis *criollo* dinilai paling baik karena termasuk kakao mulia dan memiliki mutu serta citarasa khas yang baik (Karmawati dkk. 2010). Rendahnya aerasi dalam massa kakao merupakan kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Kandungan gula pada daging buah kakao cukup tinggi, yaitu sekitar 10- 15% (Warisno dan Dahana 2009) yang merupakan faktor penting pada proses fermentasi. Bakteri asam laktat yang berperan aktif selama fermentasi berkembang biak secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhannya (Sharah dkk. 2015), sehingga pada proses fermentasi terjadi perbanyakan jumlah bakteri asam laktat.

Keberadaan bakteri asam laktat yang merupakan bakteri probiotik dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri asam laktat menghasilkan beberapa komponen antimikroba yaitu asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita dan Brashears 2002), sehingga berpotensi meningkatkan mikroflora usus yang berperan dalam mengoptimalkan kondisi kesehatan tubuh (Rahman dkk. 2012). Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit disentri sehingga bakteri ini dapat menyebabkan gangguan pencernaan yang serius. Oleh karena itu bakteri patogen ini cocok untuk dijadikan sebagai bakteri uji aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat.

Untuk mengetahui apakah isolat yang didapat merupakan salah satu spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat dilakukan karakterisasi secara molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode enzimatik yang berguna melipatgandakan sekuens nukleotida secara *in vitro* (Muladno 2010). Teknik PCR banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisa genetika. Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA memiliki daerah *hypervariable region* yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme sehingga akan diperoleh sekuens yang khas dari mikroorganisme tersebut. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi dan bioteknologi karena dinilai cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri (Rinanda 2011). Mengingat banyaknya manfaat dari Bakteri Asam Laktat dan kemampuan aktivitas antibakteri yang dimilikinya terhadap berbagai macam bakteri patogen, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang isolat BAL yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *shigella dysenteriae* dari fermentasi buah cacao merah. Serta karakterisasi molekuler isolate yang memiliki aktivitas antibakteri dengan Teknik PCR.

2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hal yang telah diuraikan di latar belakang, diketahui bahwa fermentasi buah cacao merah mengandung bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai macam bakteri pathogen. Adanya informasi tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan isolat BAL dari fermentasi buah cacao merah yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri pathogen *shigella dysenteriae*.

3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menskrining antibakteri dan mengidentifikasi gen 16S rRNA bakteri asam laktat dari fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*). Informasi ini selanjutnya akan di publikasikan dalam bentuk jurnal ilmiah.

4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai spesies bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas antibakteri yang terdapat pada fermentasi buah kakao merah. Dengan demikian dapat diaplikasikan sebagai sumber antibakteri alami dalam dunia farmasi dan Kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Deskripsi Tanaman Cacao

Kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah tanaman tahunan dari famili *Sterculiaceae*, berupa pohon dengan percabangan agak rendah dengan tinggi 3-15 meter. Ada bermacam-macam kakao, namun yang umum dibudidayakan adalah *criollo*, *forastero*, dan *Trinitario* yang merupakan varietas dari *Theobroma cacao* (Karmawati dkk. 2010). Varietas *criollo* menghasilkan biji kakao yang bermutu baik, buahnya berwarna merah atau kuning dan lebih panjang, dinding buahnya tipis meruncing, permukaan kulit buah kasar, biji buahnya besar-besar dengan kotiledonnya berwarna putih atau jingga kulit buah, setelah matang akan lepas dan berbunyi jika diguncang. Biji-biji inilah yang akan dimanfaatkan dalam industri makanan. Kakao merupakan satu-satunya dari 22 jenis marga *Theobroma*, suku *Sterculiaceae* yang diusahakan secara komersial. Kakao merah atau varietas *criollo* termasuk kakao yang bermutu tinggi atau kakao mulia atau *odel cacao* atau *fine flavour cacao*. Negara-negara penghasil kakao ini adalah Venezuela, Ekuador, Trinidad, Grenada, Srilangka, Indonesia, Samoa, Jamaica, Suriname, dan sebagian kecil India Barat (Sunanto 1992). Gula yang terkandung dalam daging buah merupakan faktor penting dalam proses fermentasi biji kakao. Glukosa, sukrosa dan fruktosa merupakan tiga jenis gula utama dalam daging buah kakao yang baik bagi pertumbuhan mikroba. Buah kakao matang memiliki daging buah berwarna putih dengan tekstur padat, lunak dan licin disebabkan oleh kandungan pectin serta polisakarida seperti selulosa, hemiselulosa dan lignin di dalamnya. Karakteristik daging buah kakao kaya akan gula-gula fermentatif seperti glukosa, fruktosa dan sukrosa serta memiliki pH rendah (3,0-3,5) yang sesuai untuk pertumbuhan khamir dan bakteri asam laktat.

2. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, non-motil, tidak bersporulasi dan memproduksi asam laktat sebagai hasil utama dari metabolisme fermentasinya (Sari dkk. 2013). Semua bakteri asam laktat bersifat anaerob fakultatif. Berdasarkan produk yang dihasilkan selama fermentasi, bakteri asam laktat dibedakan menjadi homofermentatif dan heterofermentatif (Septiarini dkk. 2013).

Beberapa hasil fermentasi yang penting dari BAL yaitu kemampuannya memproduksi komponen antimikroba, seperti asam-asam organik dan bakteriosin yang potensial untuk menghambat mikroorganisme patogen yang terdapat pada makanan dan mikroorganisme patogen terhadap manusia (Ibrahim dkk. 2010). BAL bermanfaat untuk peningkatan kualitas *hygiene* dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen. Bakteri asam laktat dapat berfungsi sebagai pengawet makanan karena mampu memproduksi asam organik, menurunkan pH lingkungannya dan mengekskresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme seperti peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehida, d-isomer asam-asam amino dan bakteriosin (Kusmiati 2002). Bakteriosin adalah protein yang disintesis secara ribosomal dihasilkan oleh sejumlah bakteri yang memiliki aktivitas bakterisidal dan bakteriostatik terhadap bakteri yang memiliki hubungan kekerabatan secara filogenetik. Bakteriosin diproduksi secara luas oleh bakteri gram positif maupun negatif (Yulineri dan Nurhidayat 2015).

3 Fermentasi

Fermentasi adalah proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba pada substrat organik yang sesuai. Proses fermentasi termasuk ke dalam reaksi katabolisme anaerob yang menggunakan substrat organik sebagai donor sekaligus akseptor elektron selama reaksi berlangsung. Fermentasi pada umumnya adalah seperangkat proses yang di dalamnya terdapat mikroba yang dibiakkan dalam suatu fermentor. Fermentor atau alat untuk melakukan fermentasi adalah suatu tangki atau tong biasa yang berisi mikroba dalam medium bahan makanan. Fermentasi cara klasik berlangsung dalam suasana anaerob (Dinata 2009).

Bahan pangan yang melalui proses fermentasi cenderung memiliki kandungan gizi yang tinggi daripada asalnya. Selama proses fermentasi terjadi perubahan sifat fisik pada substrat fermentasi, hal tersebut dikarenakan oleh aktivitas enzim terhadap senyawa kompleks dan sintesis vitamin pada saat fermentasi berlangsung. Enzim pada proses fermentasi dapat berasal dari enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan enzim yang telah ada dalam substrat fermentasi tersebut (Sari dkk. 2013). Keberhasilan proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh keberhasilan dalam mengoptimalkan faktor-faktor dari pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Faktor-faktor tersebut akan memberikan

kondisi yang berbeda untuk setiap mikroba sesuai dengan lingkungan hidupnya masing-masing sehingga mempengaruhi kinetika fermentasinya (Sharah dkk. 2015).

4 Bakteri Patogen *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae merupakan bakteri gram negatif, non motil, tidak berkapsul, tidak membentuk spora dan tumbuh baik pada kondisi aerob. *Shigella dysenteriae* tidak meragikan laktosa tetapi dapat meragikan karbohidrat lainnya. Habitat alamiah *Shigella* terbatas pada saluran cerna manusia dan primata lainnya dimana sejumlah spesies menimbulkan disentri basiler. Bentuk kokobasil pada *Shigella* dapat terjadi pada biakan muda. Bakteri *Shigella dysenteriae* menghasilkan asam dari karbohidrat namun tidak menghasilkan gas (Jawetz *et al.* 1980).

Infeksi yang disebabkan *Shigella* terbatas pada sistem gastrointestinal, penyebaran dalam aliran darah sangat jarang terjadi. *Shigella dysenteriae* memproduksi eksotoksin tidak tahan panas yang mempengaruhi usus dan susunan saraf pusat. Eksotoksin merupakan protein antigenik (merangsang produksi antitoksin) yang dapat mematikan hewan percobaan. Eksotoksin dapat menghambat penyerapan gula dan asam amino pada usus kecil. Berlaku seperti neurotoksin, eksotoksin menyebabkan rasa sakit yang hebat dan infeksi yang fatal pada reaksi susunan saraf pusat (Brooks *et al.* 2001).

5 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme (Jawetz *et al.* 1980). Berdasarkan kemampuannya senyawa antibakteri dibagi atas bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik bekerja menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan bakterisidal bekerja membunuh bakteri. Mekanisme kerja senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim dan penghambatan sintesis protein dan asam nukleat.

6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction merupakan metode enzimatik yang berguna melipatgandakan sekuen nukleotida secara *in vitro*. Teknik PCR banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisa genetika. Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang, meliputi denaturasi yang berfungsi memisahkan untai ganda DNA, *annealing* yaitu langkah pengenalan primer ke pita DNA yang sesuai dan ekstensi oleh enzim DNA Polimerase (Muladno 2010). Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung 5' menuju ujung 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR ada 30-35 siklus, meliputi denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 55-60°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi (Fatchiyah dkk. 2011).

Komponen utama PCR adalah DNA cetakan, primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dan enzim *Taq DNA polymerase*. Komponen DNA cetakan merupakan fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, biasanya berukuran pendek (kurang dari 1000 pasang basa) namun amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilakukan untuk untai DNA yang berukuran lebih besar dari 1000 pasang basa. Primer merupakan sekuen oligonukleotida rantai pendek (15-32 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Primer yang digunakan mampu mengenali urutan DNA cetakan yang akan diamplifikasi. Kandungan basa G dan C pada primer harus 45-60% dimana ujung 3' harus terdiri dari basa G dan C, serta harus dihindari susunan tiga basa berturut-turut terdiri dari basa G dan C. Urutan basa sepasang primer tidak boleh saling komplementer sehingga dapat menyebabkan dimer (Radji 2011).

Reaksi PCR dibagi menjadi tiga macam tahapan. Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan sehingga rantai DNA beruntai ganda terpisah menjadi beruntai tunggal. Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas dengan suhu 95°C selama 1-2 menit. Tahap *annealing* terjadi ketika suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan menempel pada DNA cetakan yang terpisah. Primer akan membentuk jembatan hidrogen pada cetakan sekuen yang komplementer dengan sekuen primer (Radji 2011).

7. Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA berupa polinukleotida yang besar (1500 pasang basa) dan merupakan bagian dari subunit kecil dari ribosom prokariot. Gen 16S rRNA merupakan gen pengkode RNA ribosomal. 16S rRNA bersama dengan beberapa protein kecil lainnya tergabung dalam subunit kecil ribosom. Gen 16S rRNA secara umum dimiliki oleh semua bakteri. Gen 16S rRNA merupakan target yang sensitif karena terdapat dalam jumlah yang banyak dalam sel yang aktif, jika sekuens nukleotida dari gen 16S rRNA dari dua tipe organisme sangat mirip maka kedua organisme tersebut memiliki kekerabatan yang dekat ditinjau dari kedekatan secara evolusi (Suryani dkk. 2009).

Gen 16S rRNA merupakan kepanjangan dari 16S *ribosomal RiboNucleic Acid*/ asam ribonukleat pengkode ribosom. Huruf S Pada gen 16S rRNA menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom. Gen 16S rRNA adalah gen paling lestari (*conserved*) yang mampu mempertahankan kelestariannya selama jutaan tahun keanekaragaman evolusi hal ini disebabkan karena peran yang sangat esensial dari gen ini terhadap fungsi sel. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1500 pasang basa dan sekitar 500 basa dibagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut *hypervariable region*. Daerah *hypervariable region* merupakan bagian yang membedakan antar organisme atau ciri khas dari setiap mikroorganisme. (Rinanda 2011).

8. Sekuensing DNA

Sekuensing adalah penentuan urutan basa DNA dalam segmen molekul DNA yang relatif pendek. Pengurutan asam nukleat memungkinkan mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu genom. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan dengan sekuensnya dengan sekuens DNA lainnya yang sudah diketahui. Ada dua macam metode sekuensing yaitu metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger. Sejak tahun 1980 metode sanger lebih umum digunakan (Muladno 2010).

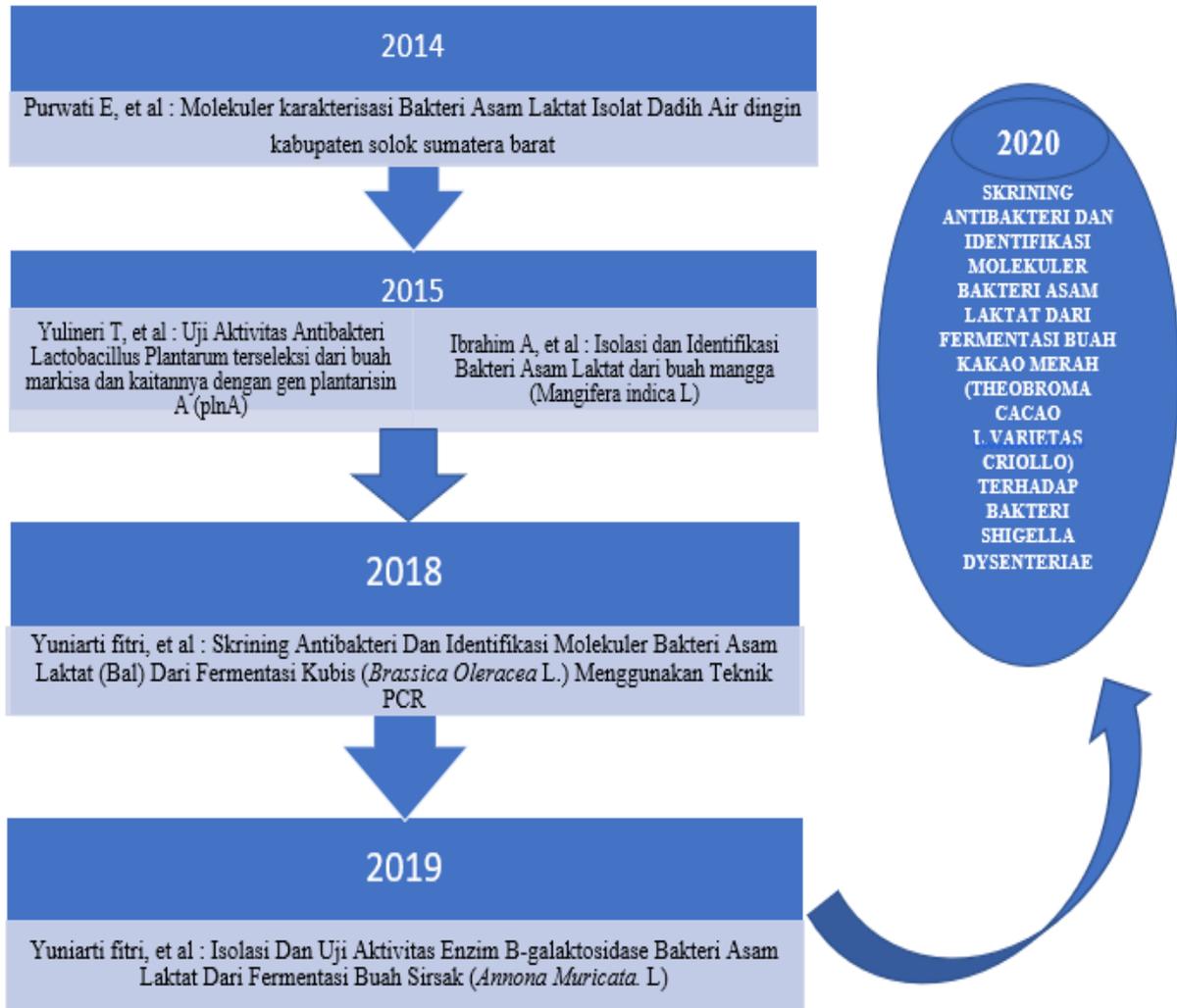
9. State Of the Art

Penelitian tentang isolasi bakteri asam laktat untuk kesehatan telah banyak dilakukan terutama yang diisolasi dari produk-produk daging mentah ataupun kalengan dan produk susu. Namun masih sedikit yang diisolasi dari buah-buahan dan sayur-sayuran terutama buah-buahan lokal. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bakteri asam laktat adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) yang dibagi menjadi tiga kelompok besar yaitu, *criollo*, *forastero* dan *trinitario*. Kakao jenis *criollo* dinilai paling baik karna termasuk kakao mulia dan memiliki mutu serta citarasa khas yang baik (Karmawati dkk. 2010). Kandungan gula pada daging buah kakao cukup tinggi, yaitu sekitar 10- 15% (Warisno dan Dahana 2009) yang merupakan faktor penting pada proses fermentasi. Bakteri asam laktat yang berperan aktif selama fermentasi berkembang biak secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhannya (Sharah dkk. 2015), sehingga pada proses fermentasi terjadi perbanyakan jumlah bakteri asam laktat.

Keberadaan bakteri asam laktat yang merupakan bakteri probiotik dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri asam laktat menghasilkan beberapa komponen antimikroba yaitu asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita dan Brashears 2002), sehingga berpotensi meningkatkan mikroflora usus yang berperan dalam mengoptimalkan kondisi kesehatan tubuh (Rahman dkk. 2012). Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit disentri sehingga bakteri ini dapat menyebabkan gangguan pencernaan yang serius. Oleh karena itu bakteri patogen ini cocok untuk dijadikan sebagai bakteri uji aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat.

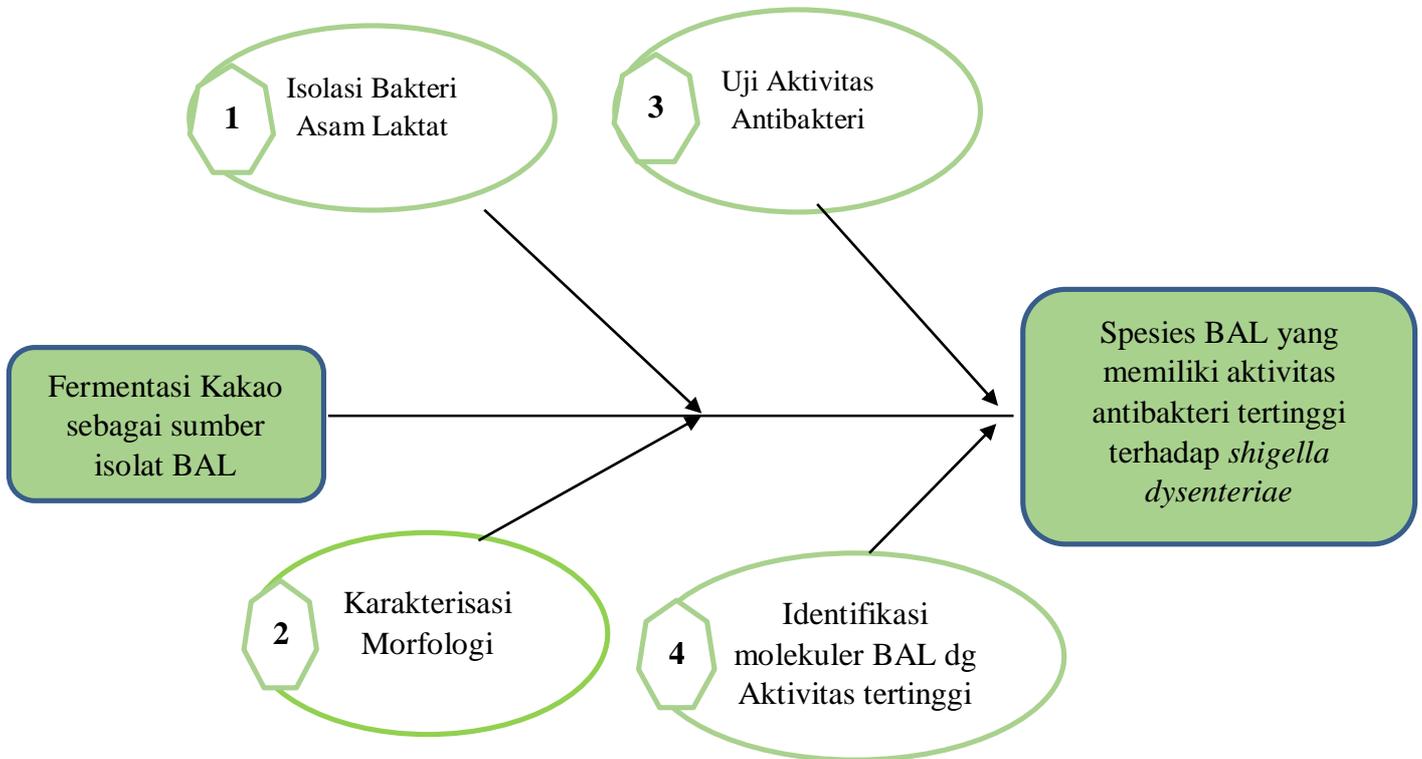
Untuk mengetahui apakah isolat yang didapat merupakan salah satu spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat dilakukan karakterisasi secara molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode enzimatik yang berguna melipatgandakan sekuen nukleotida secara *in vitro* (Muladno 2010). Mengingat banyaknya manfaat dari Bakteri Asam Laktat dan kemampuan aktivitas antibakteri yang dimilikinya terhadap berbagai macam bakteri patogen, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang isolat BAL yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *shigella dysenteriae* dari fermentasi buah cacao merah. Serta karakterisasi molekuler isolat yang memiliki aktivitas antibakteri dengan Teknik PCR.

RoadMap Penelitian



BAB III METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian



A. Lokasi penelitian : Di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka dan Laboratorium Riset Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

B. Desain Penelitian : Desain Yang digunakan adalah desain eksperimental secara kualitatif

C. Sampel Penelitian: Sampel Penelitian berupa Buah Cacao varietas merah yang sudah matang

D. Cara Kerja

i. Persiapan dan pengambilan sampel

Persiapan awal yaitu terdiri dari menyiapkan alat dan bahan serta pembuatan media. Alat-alat gelas di sterilisasi dalam oven suhu 160⁰C, medium yang telah di siapkan di sterilisasi dalam autoklaf suhu 121⁰C, laminar air flow di sterilkan menggunakan etanol 70%.

Bahan yang digunakan sebagai sampel uji adalah buah cacao varietas merah. cacao terlebih dahulu dideterminasi di Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong.

ii. Fermentasi Buah Kakao Merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*)

Sebanyak 5 gram daging buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*) yang telah matang difermentasi dengan menggunakan alat yang telah disterilkan. Kemudian buah kakao yang telah dikupas dan dipisahkan dari bijinya dibungkus dengan daun pisang lalu diletakkan dalam kotak atau wadah fermentasi selama tiga hari (Ibrahim dkk. 2015).

iii. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Hasil fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*) sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam 45 ml MRSB, kemudian dilakukan pengenceran secara berseri dari pengenceran 10^{-1} hingga pengenceran 10^{-9} (Ibrahim dkk. 2015). Pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} diambil sebagai starter kultur bakteri. Tabung reaksi yang berisi suspensi dari hasil pengenceran bakteri diambil 100 μ l, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril yang berisi media MRSA yang telah padat menggunakan metode sebar. Media agar cawan petri yang mengandung biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni- koloni yang terpisah dan berbeda bentuk dimurnikan dengan metode cawan gores dengan cara diambil 1 Ose koloni bakteri dan digoreskan pada media MRSA, setelah itu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. stok kultur diambil dari koloni murni yang tumbuh diambil 1 Ose kemudian digoreskan secara zig zag ke dalam media MRSA *slant* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

iv. Identifikasi morfologi bakteri asam laktat

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan identifikasi morfologi bakteri asam laktat secara makroskopik dan mikroskopik.

v. Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri *Shigella dysenteriae* diambil 0,1 ml inokulum bakteri menggunakan pipet mikro dicampurkan dengan 20 ml *Nutrient Agar* sampai homogen di cawan petri steril, kemudian dibiarkan memadat. Pada media yang telah berisi bakteri uji diletakkan kertas cakram yang sudah berisi suspensi bebas sel Bakteri Asam Laktat (BAL), untuk pembanding kontrol positif digunakan kertas cakram yang sudah berisi antibiotik *ciprofloxacin* sedangkan kontrol negatif menggunakan aqua destilata. Kemudian

diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong.

vi. Isolasi DNA

Ditambahkan 1 ml kultur yang telah diinkubasi pada media MRSB selama satu malam ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml. Disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 – 16.000 rpm. Diambil peletnya, kemudian disuspensikan ke dalam 480 µl EDTA 50 mM. Ditambahkan enzim lisis (*lysozym*) ke dalam pelet sel yang telah tersuspensi. Dalam total volume 120 µl perlahan dipipet dan dicampurkan.

Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 sampai 60 menit. Disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000 – 16.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang telah diambil ditambahkan dengan *nuclei lysis solution*, dipipet perlahan dan dicampurkan. Sel yang telah tersuspensi diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit untuk melisis sel, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan 3µl RNase ke dalam sel yang telah terlis, dikocok 2 hingga 5 kali untuk mencampurkan, kemudian diinkubasi selama 15-60 menit pada suhu 37°C, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan 200 µl *protein precipitation solution* pada sel yang telah ditambah RNase, divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik untuk mencampurkan *protein precipitation solution* dengan sel yang telah lisis.

Sel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 3 menit. Dipindahkan supernatan ke dalam *microcentrifuge* tube bersih yang telah berisi isopropanol, kemudian dikocok perlahan hingga benang DNA terlihat. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dituang dan tube dikeringkan dengan kertas *absorbent* secara hati-hati. Ditambahkan 600 µl etanol suhu ruang dan pelan-pelan tube dibolak-balikkan beberapa kali untuk mencuci pelet. Kemudian disentrifugasi pada 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Perlahan supernatan dituang dan tube dikeringkan dengan kertas *absorbent*. Pelet dibiarkan kering selama 10-15 menit. Ditambahkan 100µl *DNA rehydration solution* ke dalam tube dan DNA dibasahkan dengan menginkubasi pada suhu 4°C selama semalaman. DNA disimpan pada suhu 2-8°C (Promega 2014).

vii. Amplifikasi Gen 16S rRNA

Dicampurkan 12,5 µl *GoTaq Green Master Mix*, 1 µl primer 27F, 1 µl primer 1492R, 1 µl DNA yang telah diisolasi, dan *Nuclease Free Water* 9,5 µl ke dalam microtube (Promega 2012). Kondisi yang digunakan yaitu pradenaturasi 94°C selama 90 detik, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 90 detik setelah 30 siklus selesai diikuti fase akhir (*final*) pada suhu 72°C selama 5 menit (Setiarto dkk 2015). Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dalam *ThermocyclerMupid-Exu* dengan menggunakan primer 27F ; AGAGTTTGATCCTGGCTCAG untuk arah *forward* dengan primer 1492R ; GGTTACCTTGTTACGACTT untuk arah *reverse* (Jianbo *et al.* 2008).

viii. Elektroforesis Hasil Produk PCR

Sebanyak 10 µl produk PCR ditambah dengan 2 µl DNA *Loading Dye* (Thermo Scientific). Dielektroforesis pada 100 V selama 25 menit pada 1 % gel agarosa dalam 1x TAE, sebagai pembanding digunakan *DNA Ladder*, kemudian divisualisasikan dengan sinar ultraviolet setelah ditambahkan etidium bromida (Setiarto dkk. 2015).

ix. Sekuensing (Penentuan urutan DNA)

Sekuensing DNA pengkode 16S rRNA dilakukan oleh *Ist Base* melalui Lembaga Eijkman melalui dua arah yaitu arah *forward* menggunakan primer 27F dan primer 1492R untuk arah *reverse* saat proses PCR.

x. Analisis Data

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan memBLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing 16S rRNA dengan *data base* yang tersedia pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Pensejajaran ganda (*multiple alignment*) dilakukan dengan menggunakan Program Bioedit.

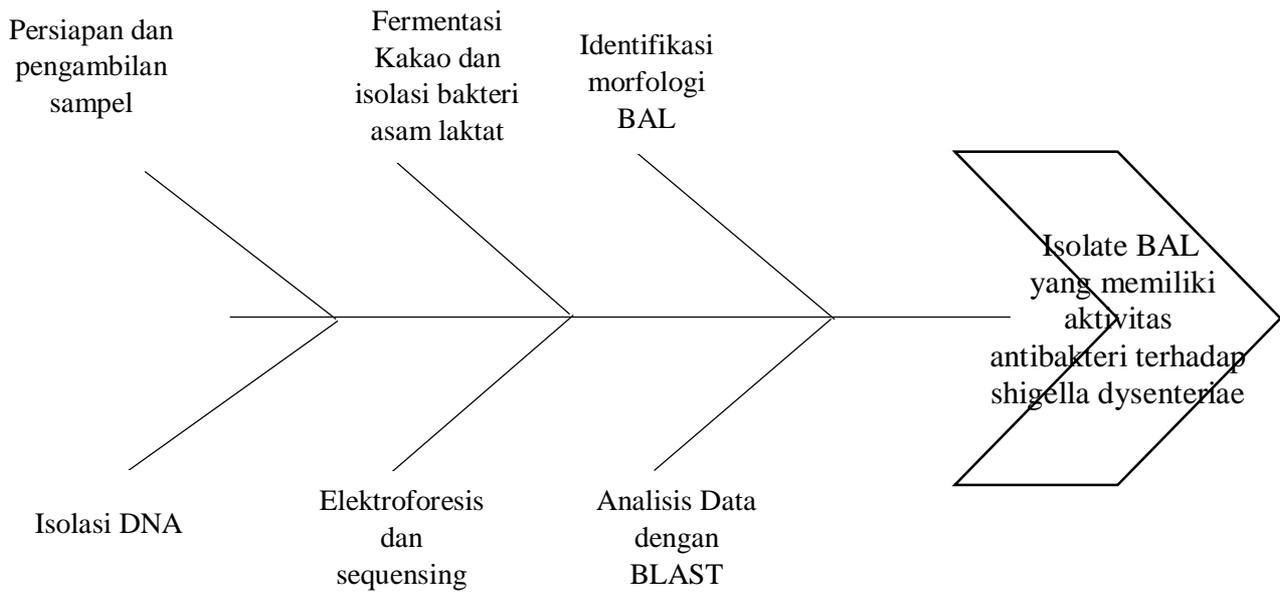
E. Indikator pencapaian hasil penelitian

Indikator pencapaian hasil penelitian yaitu dengan mendapatkan isolat BAL yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *shigella dysenteriae* ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekeliling kertas cakram. Selain itu juga didapatkan jenis spesies yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi melalui identifikasi molekuler yang dilakukan. Dengan adanya hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa BAL yang berasal dari fermentasi buah kakao merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *shigella dysenteriae*.

F. Diagram Alir Penelitian



G. Fishbond Penelitian



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daging buah dari tanaman kakao merah. Buah kakao merah yang digunakan, diperoleh dari Padang, Sumatera Barat. Buah kakao merah dideterminasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel yang digunakan merupakan jenis tanaman *Theobroma cacao* L. yang berasal dari keluarga *Sterculiaceae*.

B. Fermentasi Daging Buah Kakao Merah

Pemisahan daging buah kakao merupakan langkah awal dalam fermentasi, hal ini diperlukan untuk memisahkan daging buah dengan bijinya. Tahap selanjutnya yaitu membungkus daging buah dengan daun pisang yang bertujuan untuk menghindari kerusakan hasil fermentasi secara fisik maupun kimiawi. Pemakaian daun pisang jauh lebih aman dibanding dengan plastik karena daun pisang mengandung polifenol sama seperti daun teh yang berfungsi sebagai antioksidan, selain itu daun pisang juga bersifat kontaminan alami yang tidak berbahaya. Setelah dibungkus lalu disimpan dalam wadah fermentor selama 72 jam. Setelah disimpan selama 72 jam terjadi penurunan pH daging buah kakao dimana pH awal 6 menjadi 4, hal ini dikarenakan bakteri asam laktat termasuk bakteri yang menghasilkan sejumlah besar senyawa asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme gula (karbohidrat), asam laktat yang dihasilkan akan menurunkan nilai pH lingkungan dan menimbulkan rasa asam (Yani dkk. 2013). Selain pH, warna, rasa dan bau setelah fermentasi juga ikut berubah, warna daging buah sebelum difermentasi putih, tidak berbau dan rasanya asam manis sedangkan setelah fermentasi warna berubah menjadi putih kekuningan, berbau khas dan memiliki rasa asam manis khas seperti tape.

Fermentasi ini bertujuan untuk memperbanyak mikroorganisme dan meningkatkan metabolitnya, hal ini dapat terjadi karena kondisi saat fermentasi disesuaikan dengan kondisi pertumbuhan bakteri asam laktat sehingga proses enzimatik dan pemecahan substrat menjadi optimal kemudian menyebabkan jumlah bakteri asam laktat dan metabolitnya meningkat (Sharah dkk. 2015). Beberapa hasil fermentasi seperti asam-asam organik dan alkohol dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen karena

bakteri patogen tidak dapat tumbuh dalam suasana asam. Beberapa metabolit aktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu asam laktat, etanol dan hidrogen peroksida, metabolit tersebut merupakan agen yang dapat membunuh bakteri patogen (Ibrahim dkk. 2015).

C. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Semua proses isolasi dilakukan di dalam *laminary air flow* agar proses isolasi tidak terkontaminasi bakteri yang tidak diinginkan. Hasil fermentasi selanjutnya diperkaya dalam medium MRSB dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan pengenceran secara bertingkat. Hasil fermentasi yang telah diperkaya dalam MRSB (10^{-1}) diambil sebanyak 1 ml kemudian disuspensikan dalam 9 ml *pepton water* (10^{-2}), hasil pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 ml kemudian disuspensikan dalam 9 ml *pepton water* (10^{-3}), pengenceran dilakukan hingga 10^{-9} . Pengenceran ini bertujuan untuk mengurangi kepadatan bakteri yang akan ditanam sehingga tidak terjadi penumpukan bakteri.

Pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} diambil sebagai starter kultur bakteri untuk proses pemurnian selanjutnya. Empat pengenceran terakhir diambil karena semakin tinggi pengencerannya maka kepadatan bakteri semakin berkurang sehingga akan didapat koloni tunggal. Tabung reaksi yang berisi suspensi dari hasil pengenceran bakteri 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} diambil 100 μ l, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril yang berisi media MRSA yang telah padat menggunakan metode sebar. Pada *plate* metode sebar hasil pengenceran 10^{-6} tidak didapatkan koloni yang diinginkan karena bakteri terlalu rapat dan tidak memenuhi kriteria bentuk BAL. Pada *plate* metode sebar hasil pengenceran 10^{-7} didapatkan 4 koloni dan pada *plate* metode sebar hasil pengenceran 10^{-8} didapatkan 2 koloni yang memenuhi kriteria bentuk BAL yaitu bulat, cembung, tepian halus, dan putih susu. Sedangkan pada *plate* metode sebar hasil pengenceran 10^{-9} tidak ditemukan pertumbuhan bakteri asam laktat, hal ini kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi bakteri terlalu kecil.

Keseluruhan dari hasil metode sebar diambil 6 koloni tunggal yang berasal dari pengenceran 10^{-7} berjumlah 4 isolat dan pengenceran 10^{-8} berjumlah 2 isolat. Pemilihan 6 koloni tunggal ini didasarkan pada bentuk morfologinya yang bulat, cembung dan berwarna putih susu sesuai dengan kriteria bentuk bakteri asam laktat. Kemudian dimurnikan dalam medium MRSA dengan metode gores zig zag, hal ini dilakukan untuk

mendapatkan isolat tunggal yang lebih murni. Stok kultur diambil dari koloni murni yang tumbuh sebanyak 1 Ose kemudian digoreskan secara zig zag ke dalam media MRSA *slant* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Keenam isolat ini terdiri dari KAT371, KAT372, KAT373, KAT374, KAT381 dan KAT382. Stok isolat disimpan untuk pengujian tahap selanjutnya.

D. Identifikasi Makroskopis Dan Mikroskopis Isolat Bakteri Asam Laktat.

Identifikasi awal bakteri asam laktat dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk tepian, warna, elevasi, dan bau koloni bakteri. Dari 6 koloni tunggal yang diambil, secara makroskopis memiliki ciri bentuk bulat, cembung, tepian halus, berwarna putih susu dan berbau khas. Sedangkan identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan mengamati biakan yang sudah diwarnai di bawah mikroskop dan melihat bagaimana bentuk sel, sifat Gram dan kemampuan membentuk spora dari bakteri tersebut (Hadioetomo,1985).

Hasil identifikasi secara mikroskopis menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang didapat merupakan bakteri Gram positif sebab pada pewarnaan menunjukkan warna ungu. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga dapat menahan Kristal violet (Gram A) saat pewarnaan dan tidak luntur saat pencucian dengan alkohol. Pada pewarnaan Gram B (Iodin) berfungsi untuk memfiksasi pewarna Gram A yang diserap oleh bakteri, Sedangkan Alkohol berfungsi untuk membilas atau melunturkan kelebihan zat warna pada sel bakteri. Pewarnaan yang terakhir yaitu safranin berfungsi untuk mewarnai kembali sel-sel yang telah kehilangan warnanya setelah dibilas alkohol. Hasil identifikasi secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Morfologi BAL dari Kakao Merah

Parameter	Kode Isolat					
	KAT371	KAT372	KAT373	KAT374	KAT381	KAT382
Warna	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Koloni	susu	susu	susu	susu	susu	susu
Bentuk Koloni	Bulat, cembung					
Tepi Koloni	Rata	Rata	Rata	Rata	Rata	Rata
Warna Sel	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu
Bentuk Sel	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif

E. Uji Aktivitas Antibakteri

Sebelum uji aktivitas dilakukan, kepadatan sel bakteri patogen (T 25%) diukur terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer transmittan pada panjang gelombang 580 nm. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kepadatan sel yang berlebihan pada saat uji aktivitas. Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Shigellae dysenteriae*. Pemilihan bakteri patogen ini didasarkan karena bakteri ini berkaitan erat dengan penyakit saluran pencernaan, sedangkan bakteri asam laktat diketahui sangat bermanfaat bagi kesehatan saluran pencernaan.

Kontrol positif yang digunakan yaitu *ciprofloxacin* karena antibiotik ini merupakan pengobatan pilihan pertama pada penyakit yang disebabkan oleh *shigella* dan merupakan antibiotik spektrum luas (Katzung 1998). Keenam isolat bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam medium MRSB dan diinkubasi selama 7 hari, hasil fermentasi dari hari pertama sampai ketujuh masing-masing diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit hingga didapat 2 lapisan. Supernatan yang terbentuk digunakan untuk merendam kertas cakram dalam uji aktivitas antibakteri. Hasil uji aktivitas BAL sebagai antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Asam Laktat Terhadap Bakteri *Shigellae dysenteriae*

Kode Isolat	Hari Fermentasi						
	1	2	3	4	5	6	7
	Zona Hambat (mm)						
KAT371	7,017	10,125	9,275	8,125	6,717	6,867	7,017
KAT372	7,083	9,267	9,367	8,425	7,233	7,033	7,117
KAT373	6,708	8,558	8,333	7,767	6,700	6,750	6,817
KAT374	6,725	8,075	8,367	6,767	6,717	6,717	6,873
KAT381	6,717	7,575	9,342	7,175	6,783	6,817	6,910
KAT382	6,783	8,875	8,175	6,725	6,767	6,783	6,717
Kontrol +	16,47						
Kontrol -	0						

Hasil uji aktivitas bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghambat *Shigellae dysenteriae* yang ditandai dengan zona hambat yang terbentuk disekitar cakram. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri *Shigella dysenteriae*

memiliki nilai tidak terlalu besar . Hal ini disebabkan karena *Shigellae dysenteriae* memiliki ketahanan terhadap pH asam, dimana salah satu mekanisme antibakteri dari bakteri asam laktat sendiri yaitu menurunkan pH sekitar sehingga bakteri patogen tidak dapat mempertahankan pHnya yang menyebabkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler dari bakteri patogen tersebut (Septiarini dkk. 2013).

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa semua isolat bakteri asam laktat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigellae dysenteriae* pada semua waktu fermentasi. Hal ini disebabkan karena pada umumnya bakteri asam laktat menghasilkan senyawa metabolit primer seperti asam laktat, asam asetat dan hidrogen peroksida pada fase logaritmik (Djide dan Sartini 2008). Metabolit sekunder dari bakteri asam laktat seperti bakteriosin yang terbentuk pada fase stasioner juga berperan penting dalam penghambatan bakteri patogen. Isolat KAT372 dipilih untuk dikarakterisasi dengan metode PCR karena isolat KAT372 memiliki nilai rata-rata zona hambat lebih besar dari isolat lainnya serta memiliki rata rata zona hambat paling tinggi setiap harinya pada bakteri *Shigellae dysenteriae*.

F. Isolasi DNA Bakteri Asam Laktat

Cara kerja isolasi DNA bakteri asam laktat dalam penelitian ini mengikuti protokol yang tertera pada protokol *wizard genomic DNA purification kit* dari promega. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari molekul lain di dalam sel. Setelah diinokulasi semalaman, 1 ml kultur terpilih disentrifugasi dengan kecepatan 13.000-16.000 rpm. Hal ini berfungsi untuk memisahkan DNA dari zat lain berdasarkan berat molekulnya. Setelah disentrifugasi dan menjadi 2 lapisan, pelet diambil lalu ditambahkan EDTA yang berfungsi untuk merusak dinding sel secara kimiawi (Muladno 2010). Penambahan lisozim berfungsi untuk memecah dinding sel (Fatchiyah dkk. 2011).

Setelah diinkubasi dan disentrifugasi, pelet ditambahkan dengan *nuclei lysis solution* yang berfungsi untuk memecahkan sel dan nukleus. Pada tahap selanjutnya penambahan RNase berfungsi untuk memurnikan DNA dari kontaminan RNA sebab RNase akan merusak RNA tapi tidak dengan DNA. Penambahan *protein precipitation solution* di tahap berikutnya bertujuan untuk mengendapkan protein, *protein precipitation solution* berisi enzim proteinase K yang menyebabkan protein menjadi lisis dan tidak larut (Muladno 2010). Isopropanol dan etanol berfungsi untuk mengendapkan DNA sehingga

DNA akan terpisah di bawah tube. Pada tahap terakhir, penambahan *DNA rehydration* berfungsi untuk pembasahan DNA sehingga saat penyimpanan DNA tidak mudah rusak. Isolat DNA disimpan pada suhu 2-8°C untuk menghindari kerusakan DNA yang telah diisolasi.

G. Amplifikasi DNA Bakteri Asam Laktat Dengan PCR

Tahap pertama dalam amplifikasi yaitu pradenaturasi yang bertujuan untuk menyiapkan untai DNA yang akan didenaturasi sekaligus mengaktifasi *Taq DNA Polymerase*. Tahap selanjutnya adalah denaturasi yang berfungsi untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap akan menyebabkan renaturasi secara cepat, sedangkan waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mempengaruhi kerja enzim *Taq DNA polymerase*. Pada tahap ketiga yaitu *annealing* bertujuan untuk memberi waktu primer untuk menempel pada target (Radji 2011). Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksil (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA.

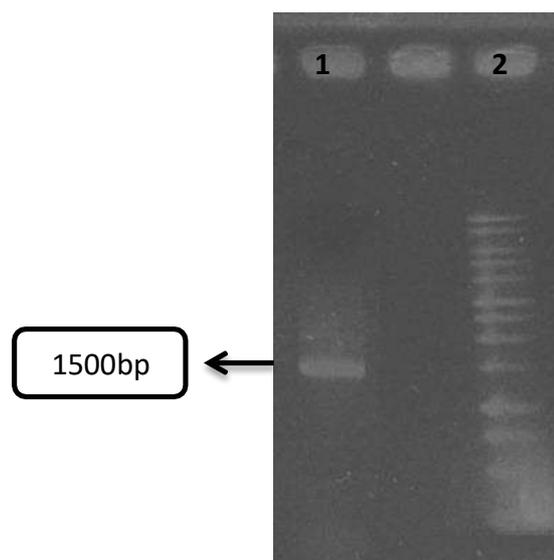
Proses selanjutnya setelah penempelan primer yaitu ekstensi atau perpanjangan. Proses ekstensi berfungsi untuk memperpanjang ikatan DNA yang telah ditempel oleh primer. DNA akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Setiap satu kilobasa (1000 pasang basa) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit, jika kurang dari 500 pasang basa dibutuhkan waktu 30 detik dan pada kisaran 500 tetapi kurang dari 1000 pasang basa memerlukan waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1 kilobasa membutuhkan waktu 2 menit di setiap siklusnya (Muladno 2010).

Penelitian ini menggunakan kit dari promega untuk amplifikasi yaitu *Go Taq Green Master mix*, untuk primer digunakan primer 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) untuk arah *forward* yang menempel pada ujung 5' untai DNA target yang telah terurai sebelumnya, dan primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) untuk arah *reverse* yang akan menempel pada ujung 5' rantai tunggal lainnya (Jianbo *et al.* 2008). Primer 27F dan 1492R dipilih karena merupakan primer universal yang sering digunakan dalam identifikasi bakteri asam laktat. Proses denaturasi, penempelan dan perpanjangan diatur sebanyak 30 siklus. Proses PCR diakhiri dengan pemanjangan akhir untuk

menyempurnakan proses pemanjangan pita DNA yang terbentuk. Hasil PCR kemudian disimpan pada suhu 0°C untuk menghindari kerusakan. Amplikon selanjutnya dielektroforesis untuk memastikan hasil positif dengan adanya fragmen DNA.

H. Elektroforesis Hasil Amplifikasi DNA Bakteri Asam Laktat

Hasil elektroforesis amplikon pada Gambar 1 menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya fragmen DNA. Panjang fragmen pada hasil elektroforesis berada di kisaran 1500 pasang basa yang berarti intensitas fragmen yang dihasilkan cukup tinggi, ini sesuai dengan panjang Gen 16S rRNA yang memiliki panjang sekitar 1500 pasang basa. Pada penelitian ini sebagai *DNA ladder* digunakan *Bench Top 1kb DNA Ladder*. Pada garis pertama *DNA ladder* menunjukkan 250 pasang basa, garis kedua 500 pasang basa, garis ketiga 750 pasang basa dan garis terakhir menunjukkan 10.000 pasang basa. Untuk *Loading Dye* digunakan *6x DNA Loading Dye* dari Thermo Scientific. Amplikon selanjutnya dikirim ke *Eijkman Institute For Molecular Biology* untuk disekuensing.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Amplifikasi DNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372. Lajur 1: Produk PCR, Lajur 2: *DNA Ladder* 1kb

I. Analisis Hasil Sekuensing

Sekuensing Gen 16S rRNA dari hasil amplifikasi dengan PCR dilakukan oleh *Eijkman Institute For Molecular Biology* di Jakarta. Sekuensing Gen 16S rRNA dilakukan dari dua arah, yaitu arah *forward* menggunakan primer 27F dan primer 1492R untuk arah *reverse* saat proses PCR. Sekuensing DNA dilakukan untuk menentukan identitas serta persen kemiripan isolat bakteri yang didapat dengan mengurutkan basa nukleotida. Hasil

analisis urutan basa nukleotida disebut elektroferogram, berupa urutan basa A, T, G, C yang menyusun urutan basa sesuai dengan primer yang digunakan (Muladno 2010).

Hasil sekuensing yang berupa elektroferogram ini belum bisa digunakan untuk menentukan identitas isolat, perlu diolah terlebih dahulu untuk bisa disejajarkan dengan program BLAST. Dalam penelitian ini digunakan program Bioedit untuk mengolah data hasil sekuensing. Data hasil sekuens primer *forward* dan *reverse* dibuka dalam satu tab alignment, kemudian orientasi sekuens kedua primer disamakan dengan cara *reverse compliment* dan *pairwise alignment*, lalu dibuat konsensus dengan *create consensus*. *Consensus* inilah yang bisa digunakan dalam penyejajaran program BLAST. *Consensus* digunakan untuk mengontruksi kembali rangkaian urutan DNA yang saling tumpang tindih menjadi bentuk tunggal untuk selanjutnya dianalisis dengan program BLAST. *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) merupakan algoritma yang digunakan untuk membandingkan urutan nukleotida dari asam nukleat dari hasil penelitian dengan sekuens-sekuens DNA dari berbagai penjuru di dunia yang telah dipublikasikan dalam database (Nurhikmayani dkk. 2015).

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lactobacillus fabifermentans strain DSM 21115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%	NR_113339.1
Lactobacillus fabifermentans strain LMG 24284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%	NR_042876.1
Lactobacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0	99%	NR_104573.1
Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0	99%	NR_117813.1
Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0	99%	NR_042394.1
Lactobacillus paraplantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0	99%	NR_025447.1
Lactobacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0	99%	NR_029133.1
Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2507	2507	99%	0.0	99%	NR_113338.1
Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2505	2505	99%	0.0	99%	NR_112890.1
Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2505	2505	99%	0.0	99%	NR_115805.1

Gambar 2. Deskripsi Hasil Nucleotide BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372 Dari Fermentasi Buah Kakao

Gambar 2 menunjukkan bahwa urutan basa nukleotida dari isolat KAT372 hasil fermentasi buah kakao memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans* dengan nilai *query coverage* sebesar 99%, *Identification* 99%, *max score* 2571, *E value* 0. Persen identitas menunjukkan persen kesamaan basa nukleotida antara isolat yang didapat dengan database *GenBank*. Nilai *E Value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Nilai *E Value* yang semakin besar menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan nilai *E Value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Pada hasil *nucleotide* BLAST Persen identitas 97% dapat didefinisikan kemiripannya pada

tingkat genus dan persen identitas 99% dapat didefinisikan kemiripannya pada tingkat spesies (Drancourt *et al.* 2000).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 6 isolat bakteri asam laktat dari fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*) beraktivitas antibakteri dengan isolat KAT372 yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Shigella dysenteriae* dan diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115 dengan kemiripan 99%.

B. Saran

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen lain dan uji aktivitas lainnya.

BAB VI
LUARAN YANG DICAPAI

A. LUARAN WAJIB

Nama Jurnal	Al-Kauniah
Website Jurnal	journal.uinjkt.ac.id/index.php/kauniah/user
Status Makalah	In Review
Jenis Prosiding	-
Tanggal Submit	18 Oktober 2020

B. LUARAN TAMBAHAN

Sebagai Pemakalah (Oral Presenter) pada seminar internasional ICNSSE 2020.

BAB VII. RENCANA TINDAK LANJUT DAN PROYEKSI HILIRISASI

Hasil penelitian yang telah didapatkan merupakan pengembangan ilmu dari mikrobiologi dimana didapatkan sumber alami bakteri asam laktat yang berasal dari fermentasi buah kakao merah yang memiliki keunggulan dibandingkan sumber bakteri asam laktat yang lain, seperti dari buah kakao atau buah2an yang tanpa proses fermentasi. Keunggulannya yaitu terjadinya reaksi enzimatik yang optimal pada buah kakao yang melalui proses fermentasi, karena pada proses fermentasi dilakukan penyesuaian kondisi lingkungan tempat tumbuh dari bakteri asam laktat tersebut. Sehingga reaksi enzimatik yang optimal tersebut dapat meningkatkan jumlah dan kualitas dari bakteri asam laktat yang di hasilkan. Selain itu juga merupakan pengembangan ilmu bioteknologi dan kesehatan, dimana pada penelitian ini didapatkan spesies bakteri asam laktat dari fermentasi kakao merah yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri patogen *shigella dysenteriae* yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibakteri alami.

Setelah dilakukannya penelitian ini, peneliti akan melanjutkan untuk melakukan uji aktifitas farmakologi bakteri asam laktat dari fermentasi buah kakao merah dengan berbagai macam parameter, sehingga nantinya dapat digunakan sebagai kondisi atau bahan pertimbangan dalam menghasilkan produk kesehatan yang mengandung bakteri probiotik yang baik untuk Kesehatan dari fermentasi buah kakao merah. Selain itu peneliti juga akan melakukan identifikasi secara molekuler terhadap BAL dari fermentasi kakao merah yang memiliki aktifitas farmakologi yang paling bagus terhadap berbagai macam parameter yang diujikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amezquita A, Brashears MM. 2002. Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready to Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria. *Journal Food Protection*. **65**(2): 316-325
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*, Terjemahan: Mudihardi E, Kuntaman, Wasito EB, Mertaniasih NM, Harsono S, Alimsardjono L. Jakarta. Penerbit Salemba Medika. Hlm. 290-364.
- Dinata DI. 2009. *Bioteknologi Pemanfaatan Mikroorganisme dan Teknologi Bioproses*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 28-59.
- Djide MN, Sartini. 2008. Isolasi, Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Kol (*Brassica oleracea* L.) dan Potensinya sebagai Antagonis *Vibrio harveyi* *In Vitro*. *Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin*. **18**(3): 211-216.
- Drancourt M, Bollet C, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of A Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**(10): 3623-3630.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta. Hlm. 48-56.
- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hlm. 38-39.
- Ibrahim A, Fridayanti A, Delvia F. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1**(2): 8-13.
- Jawetz E, Melnick L, Adelberg EA. 1980. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 14. Terjemahan: Bonang G. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 284-330
- Jianbo J, Young SK, Jin Q, Eom HJ, Han NS. 2008. Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Takju Korean Rice Wine. Cheongju. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **18**(10): 1678-1682
- Karmawati E, Mahmud Z, Syakir M, Munarso SJ, Ardana IK, Rubiyo. 2010. *Budidaya dan Pascapanen Kakao*. Puslitbang Perkebunan. Bogor. Hlm. 10-16
- Katzung GB. 1998. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi 6. Terjemahan: Agoes A, Chaidir J, Munaf S, Tanzil S, Kamaludin MT, Nattadipura S, Leilani Y, Aziz S, Theodorus. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 772-773.

- Kusmiati MA. 2002. Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* PBAC 1 pada Berbagai Media. *Makara Kesehatan*. **6**(1): 1-7.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Edisi 2. IPB Press. Bogor. Hlm. 6-31
- Nurhikmayani R, Rosana A, Zaraswati D. 2015. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik Pedaging *Anas domesticus* dengan Gen 16s rRNA. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Terjemahan: Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. UI Press. Jakarta. Hlm. 99-188.
- Promega Corporation. 2012. *Go Taq Green Master Mix*. USA.
- Promega Corporation. 2014. *Wizard Genomic DNA Purification Kit*. USA.
- Radji M. 2011. *Rekayasa Genetika*. Sagung Seto. Jakarta. Hlm. 48-53.
- Rahman DH, Tanziha I, Usmiati S. 2012. Formulasi Produk Susu Fermentasi Kering dengan Penambahan Bakteri Probiotik *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium longum*. *Jurnal Gizi dan Pangan*. **7**(1): 49-54.
- Rinanda T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. **11**(3): 172-177.
- Sari YNM, Syukur S, Jamsari. 2013. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). *Jurnal Kimia Unand*. **2**(2): 81-91
- Sharah A, Karnila R, Desmelati. 2015. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Ikan Peda Kembang (*Rastrelliger sp.*). *Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau*. **15**(1): 168-175.
- Septiarini WE, Padaga MC, Oktaviane DA. 2013. Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Diisolasi dari Feses Orangutan (*Pongo pygmaeus*) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Enterik Patogen Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **13**(11): 127-133
- Setiarto RHB, Jenie BSL, Faridah DN, Saskiawan I, Sulistiani. 2015. Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil Amilase dan Pululanase dan Aplikasinya pada Fermentasi Talas. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **26**(1): 80-89.
- Sunanto H. 1992. *Cokelat Pengelolaan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Kanisus. Yogyakarta. Hlm. 5-14.

- Suryani, Ambarsari L, Harahap ES. 2009. Amplifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Gunung Pancar Bogor. *Jurnal Riset dan Teknologi Kimia Lingkungan*. **3**(1): 83-89.
- Warisno, Dahana K. 2009. *Inspirasi Usaha Membuat Aneka Nata*. PT Agro Media Pustaka. Jakarta. Hlm. 5.
- Yani L, Roza RM, Martina A. 2013. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Yoghurt Produksi Industri Rumah Tangga di Pekanbaru yang Bersifat Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Kampus Binawidya Pekanbaru*. **8**(3): 93-99.
- Yulineri T, Nurhidayat N. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri *Lactobacillus Plantarum* Terseleksi dari Buah Markisa (*Passiflora edulis*) dan Kaitannya dengan Gen Plantarisin A (plnA). *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. **1**(2): 270-277.

LAMPIRAN

Bukti submit jurnal akreditasi sinta 2

The screenshot displays the journal's submission interface. At the top, there is a navigation bar with links like HOME, ABOUT, USER HOME, CATEGORIES, SEARCH, CURRENT, ARCHIVES, ANNOUNCEMENTS, PUBLICATION ETHICS, and AUTHOR GUIDELINES. The main content area shows the submission summary for article #17817, with buttons for SUMMARY, REVIEW, and EDITING. The submission details include the author's name, title, original file name, submission date, and the editor's name. A sidebar on the left provides user options like 'My Journals', 'My Profile', and 'Log Out'. The right sidebar contains links for 'Focus and Scope', 'Editorial Team', 'Online Submissions', 'Author Fees', 'Contact', and 'Reviewers'. Logos for SINTA, DOAJ, Crossref, and Google are visible in the bottom left, while 'Journal Template', 'Recommended Tools' (Grammarly, Plagiarism Checker), and 'Reference Manager zotero' are in the bottom right.

SKRINING ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI BUAH KAKAO MERAH (THEOBROMA CACAO L.VARIETAS CRIOLLO) TERHADAP BAKTERI SHIGELLA DYSENTERIAE

ANTIBACTERIAL SCREENING AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM FERMENTATION OF RED CACAO FRUIT (THEOBROMA CACAO L. VARIETAS CRIOLLO) ON SHIGELLA DYSENTERIAE BACTERIA

Fitri Yuniarti^{1*}, Wahyu Hidayati¹, Fitriani¹, Audina Sarah¹

¹Universitas Muhammadiyah Prof DR Hamka, Jl Delima Raya II/IV Perumnas Klender, Jakarta Timur.13460

*Corresponding author: fitri_yuniarti@uhamka.ac.id

Abstrak

Cacao merupakan salah satu komoditas perkebunan dan Sumber Daya Alam Indonesia yang memiliki peranan cukup penting, terutama dalam pengembangan habitat tumbuhnya berbagai mikroorganisme baik, salah satunya Bakteri Asam Laktat (BAL) yang baik untuk kesehatan

pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat dari fermentasi buah cacao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*), melakukan skrining antibakteri dan melakukan identifikasi gen 16S rRNA BAL yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini diawali dengan isolasi bakteri asam laktat dari fermentasi buah cacao merah, setelah itu dilakukan skrining aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap bakteri uji *Shigella dysenteriae*. Dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan primer 27F dan 1492R. Hasil amplifikasi disekuensing dan dilakukan penyejajaran data pada program BLAST. Hasil Penelitian menunjukkan bahwa isolat KAT372 memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi. Hasil sekuensing dan penyejajaran dengan BLAST didapatkan bahwa isolat KAT372 memiliki 99% kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa Isolat BAL dari fermentasi buah cacao merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*, sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibakteri alami.

Kata kunci: Bakteri Asam Laktat, Cacao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*), Antibakteri, *Shigella dysenteriae*, PCR.

Abstract

Cacao is one of Indonesia's plantation commodities and natural resources which plays an important role, especially in the development of habitats for the growth of various good microorganisms, one of which is Lactic Acid Bacteria (LAB) which is good for digestive health. This study aims to obtain lactic acid bacterial isolates from the fermentation of red cacao fruit (Theobroma cacao L. criollo variety), carry out antibacterial screening and identify the 16S rRNA LAB gene which has the highest antibacterial activity using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. This study began with the isolation of lactic acid bacteria from the fermentation of the red cacao fruit, after which antibacterial activity was screened using the disc diffusion method against the Shigella dysenteriae test bacteria. Followed by amplification using primers 27F and 1492R. The amplification results were sequenced and data alignment was carried out in the BLAST program. The results showed that the KAT372 isolate had the highest antibacterial activity. The results of sequencing and alignment with BLAST showed that the KAT372 isolate had 99% similarity to Lactobacillus fabifermentans strain DSM 21115. From the above data it can be concluded that LAB isolate from fermented red cacao fruit has antibacterial activity against Shigella dysenteriae, so that later it can be used as a natural antibacterial source..

Keywords: *Lactic Acid Bacteria, Cacao red (Theobroma cacao L. criollo variety), Antibacterial, Shigella dysenteriae, PCR.*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan berbagai sumber daya alam, salah satunya berbagai jenis tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan yang memiliki peranan cukup penting, terutama memiliki keuntungan untuk pengembangan habitat tumbuhnya berbagai mikroorganisme baik, salah satunya bakteri asam laktat yang baik untuk kesehatan pencernaan. Penelitian tentang isolasi bakteri asam laktat untuk kesehatan telah banyak dilakukan terutama yang diisolasi dari produk-produk daging mentah ataupun kalengan dan produk susu. Namun masih sedikit yang diisolasi dari buah-buahan dan

sayur-sayuran terutama buah-buahan lokal. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan sayuran seperti durian, nenas, sirsak, kakao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, dan kacang panjang merupakan sumber potensial bakteri asam laktat (Sari et al., 2013). Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bakteri asam laktat adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao*. L) yang dibagi menjadi tiga kelompok besar yaitu, *criollo*, *forastero* dan *trinitario*.

Kakao jenis *criollo* dinilai paling baik karna termasuk kakao mulia dan memiliki mutu serta citarasa khas yang baik (Karmawati et al., 2010). Rendahnya aerasi dalam massa kakao merupakan kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Kandungan gula pada daging buah kakao cukup tinggi, yaitu sekitar 10- 15% (Warisno & Dahana, 2009) yang merupakan faktor penting pada proses fermentasi. Bakteri asam laktat yang berperan aktif selama fermentasi berkembang biak secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhannya (Sharah et al., 2015), sehingga pada proses fermentasi terjadi perbanyakan jumlah bakteri asam laktat.

Keberadaan bakteri asam laktat yang merupakan bakteri probiotik dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri asam laktat menghasilkan beberapa komponen antimikroba yaitu asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita & Brashears, 2002), sehingga berpotensi meningkatkan mikroflora usus yang berperan dalam mengoptimalkan kondisi kesehatan tubuh (Rahman et al., 2012). Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit disentri sehingga bakteri ini dapat menyebabkan gangguan pencernaan yang serius. Oleh karena itu bakteri patogen ini cocok untuk dijadikan sebagai bakteri uji aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat.

Untuk mengetahui apakah isolat yang didapat merupakan salah satu spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat dilakukan karakterisasi secara molekuler menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode enzimatik yang berguna melipatgandakan sekuens nukleotida secara *in vitro* (Muladno, 2010). Teknik PCR banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisa genetika. Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA memiliki daerah *hypervariable region* yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme

sehingga akan diperoleh sekuens yang khas dari mikroorganisme tersebut. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi dan bioteknologi karna dinilai cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri (Rinanda, 2011).

Mengingat banyaknya manfaat dari Bakteri Asam Laktat dan kemampuan aktivitas antibakteri yang dimilikinya terhadap berbagai macam bakteri patogen, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang isolat BAL yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *shigella dysenteriae* dari fermentasi buah cacao merah. Serta karakterisasi molekuler isolat yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan Teknik PCR. Berdasarkan hal ini diharapkan bakteri asam laktat yang berhasil di isolasi pada penelitian ini dapat dijadikan sebagai sumber antibakteri alami yang bermanfaat bagi kesehatan terutama penderita gangguan pencernaan yang disebabkan oleh bakteri *shigella dysenteriae*. Selain itu buah cacao hasil fermentasi juga membawa dampak positif di dalam dunia industri dan kesehatan karena akan menghasilkan buah cacao probiotik yang baik untuk usus yang mengkonsumsinya.

MATERIAL DAN METODE

Fermentasi Buah Kakao Merah (*Theobroma cacao L. varietas criollo*)

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah kakao merah yang didapatkan dari perkebunan di Provinsi Sumatera Barat. Sebanyak 5 gram daging buah kakao merah (*Theobroma cacao L. varietas criollo*) yang telah matang difermentasi dengan menggunakan alat yang telah disterilkan. Kemudian buah kakao yang telah dikupas dan dipisahkan dari bijinya dibungkus dengan daun pisang lalu diletakkan dalam kotak atau wadah fermentasi selama tiga hari (Ibrahim et al., 2015).

Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Fermentasi Buah Kakao Merah

Hasil fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao L. varietas criollo*) sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam 45 ml MRSB, kemudian dilakukan pengenceran secara berseri dari pengenceran 10^{-1} hingga pengenceran 10^{-9} (Ibrahim et al., 2015). Pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} diambil sebagai starter kultur bakteri. Tabung reaksi yang berisi suspensi dari hasil pengenceran bakteri diambil 100 μ l, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril yang berisi media MRSB yang telah padat menggunakan metode sebar. Media agar cawan petri yang mengandung biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24

jam. Koloni- koloni yang terpisah dan berbeda bentuk dimurnikan dengan metode cawan gores dengan cara diambil 1 Ose koloni bakteri dan digoreskan pada media MRSA, setelah itu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. stok kultur diambil dari koloni murni yang tumbuh diambil 1 Ose kemudian digoreskan secara zig zag ke dalam media MRSA *slant* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Ibrahim et al., 2015).

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan identifikasi morfologi bakteri asam laktat secara makroskopik dan mikroskopik.

Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri *Shigella dysenteriae* diambil 0,1 ml inokulum bakteri menggunakan pipet mikro dicampurkan dengan 20 ml *Nutrient Agar* sampai homogen di cawan petri steril, kemudian dibiarkan memadat. Pada media yang telah berisi bakteri uji diletakkan kertas cakram yang sudah berisi suspensi bebas sel Bakteri Asam Laktat (BAL), untuk pembandingan kontrol positif digunakan kertas cakram yang sudah berisi antibiotik *ciprofloxacin* sedangkan kontrol negatif menggunakan aqua destilata. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong.

Isolasi DNA

Ditambahkan 1 ml kultur yang telah diinkubasi pada media MRSB selama satu malam ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml. Disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 – 16.000 rpm. Diambil peletnya, kemudian disuspensikan ke dalam 480 µl EDTA 50 mM. Ditambahkan enzim lisis (*lysozym*) ke dalam pelet sel yang telah tersuspensi. Dalam total volume 120 µl perlahan dipipet dan dicampurkan.

Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 sampai 60 menit. Disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000 – 16.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang telah diambil ditambahkan dengan *nuclei lysis solution*, dipipet perlahan dan dicampurkan. Sel yang telah tersuspensi diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit untuk melisis sel, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan 3µl RNase ke dalam sel yang telah terlisis, dikocok 2 hingga 5 kali untuk mencampurkan, kemudian diinkubasi selama 15-60 menit pada suhu 37°C, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ditambahkan 200 µl *protein precipitation solution* pada sel yang telah ditambah RNase,

divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik untuk mencampurkan *protein precipitation solution* dengan sel yang telah lisis.

Sel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 3 menit. Dipindahkan supernatan ke dalam *micosentifuge* tube bersih yang telah berisi isopropanol, kemudian dikocok perlahan hingga benang DNA terlihat. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dituang dan tube dikeringkan dengan kertas *absorbent* secara hati-hati. Ditambahkan 600 µl etanol suhu ruang dan pelan-pelan tube dibolak-balikkan beberapa kali untuk mencuci pelet. Kemudian disentrifugasi pada 13.000-16.000 rpm selama 2 menit. Perlahan supernatan dituang dan tube dikeringkan dengan kertas *absorbent*. Pelet dibiarkan kering selama 10-15 menit. Ditambahkan 100µl *DNA rehydration solution* ke dalam tube dan DNA dibasahkan dengan menginkubasi pada suhu 4°C selama semalaman. DNA disimpan pada suhu 2-8°C (Promega, 2014).

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Dicampurkan 12,5 µl *GoTaq Green Master Mix*, 1 µl primer 27F, 1 µl primer 1492R, 1 µl DNA yang telah diisolasi, dan *Nuclease Free Water* 9,5 µl ke dalam microtube (Promega 2012). Kondisi yang digunakan yaitu pradenaturasi 94°C selama 90 detik, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 90 detik setelah 30 siklus selesai diikuti fase akhir (*final*) pada suhu 72°C selama 5 menit (Setiarto dkk 2015). Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dalam *ThermocyclerMupid-Exu* dengan menggunakan primer 27F ; AGAGTTTGATCCTGGCTCAG untuk arah *forward* dengan primer 1492R ; GGTTACCTTGTTACGACTT untuk arah *reverse* (Jianbo et al., 2008).

Elektroforesis Hasil Produk PCR

Sebanyak 10 µl produk PCR ditambah dengan 2 µl *DNA Loading Dye* (Thermo Scientific). Dielektroforesis pada 100 V selama 25 menit pada 1 % gel agarosa dalam 1x TAE, sebagai pembanding digunakan *DNA Ladder*, kemudian divisualisasikan dengan sinar ultraviolet setelah ditambahkan etidium bromida (Setiarto et al., 2015).

Sekuensing (Penentuan urutan DNA)

Sekuensing DNA pengkode 16S rRNA dilakukan oleh *Ist Base* melalui Lembaga Eijkman melalui dua arah yaitu arah *forward* menggunakan primer 27F dan primer 1492R untuk arah *reverse* saat proses PCR.

Analisis Data

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan memBLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing 16S rRNA dengan *data base* yang tersedia pada situs *www.ncbi.nlm.nih.gov*. Pensejajaran ganda (*multiple alignment*) dilakukan dengan menggunakan Program Bioedit.

HASIL

Isolasi dan karakterisasi morfologi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Pemisahan daging buah kakao merupakan langkah awal dalam fermentasi. Proses fermentasi menyebabkan terjadi penurunan pH daging buah kakao dari pH awal 6 menjadi 4. Warna, rasa dan bau setelah fermentasi juga ikut berubah, warna daging buah sebelum difermentasi putih, tidak berbau dan rasanya asam manis sedangkan setelah fermentasi warna berubah menjadi putih kekuningan, berbau khas dan memiliki rasa asam manis khas seperti tape. Isolasi Bakteri Asam Laktat diawali dengan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} sampai 10^{-9} . Pada penelitian ini didapatkan 6 isolat yang terdiri dari isolat KAT371, KAT372, KAT373, KAT374, yang berasal dari pengenceran 10^{-7} , dan isolat KAT381, KAT382 berasal dari pengenceran 10^{-8} . Stok isolat disimpan untuk pengujian ke tahap selanjutnya. Pemilihan koloni tunggal berdasarkan bentuk morfologi terbaik yang mencirikan koloni BAL yaitu bulat, cembung, licin, dan bewarna putih susu. Untuk identifikasi secara mikroskopis menunjukkan warna sel ungu, dan berbentuk basil. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Morfologi BAL dari Kakao Merah

Parameter	Kode Isolat					
	KAT371	KAT372	KAT373	KAT374	KAT381	KAT382
Warna	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Koloni	susu	susu	susu	susu	susu	susu
Bentuk Koloni	Bulat, cembung					
Tepi Koloni	Rata	Rata	Rata	Rata	Rata	Rata
Warna Sel	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu	Ungu
Bentuk Sel	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif

Skrining Aktivitas Antibakteri

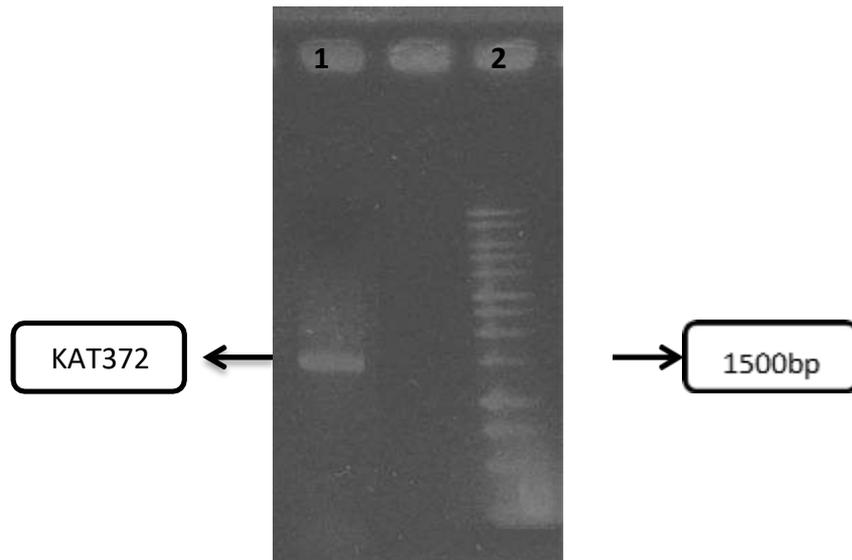
Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Shigella dysenteriae*. dan kontrol positif yaitu *ciprofloxacin*. Hasil uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghambat *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan zona hambat yang terbentuk disekitar cakram. Hasil uji aktivitas BAL sebagai antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Bakteri Asam Laktat Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*

Kode Isolat	Hari Fermentasi						
	1	2	3	4	5	6	7
	Zona Hambat (mm)						
KAT371	7,017	10,125	9,275	8,125	6,717	6,867	7,017
KAT372	7,083	9,267	9,367	8,425	7,233	7,033	7,117
KAT373	6,708	8,558	8,333	7,767	6,700	6,750	6,817
KAT374	6,725	8,075	8,367	6,767	6,717	6,717	6,873
KAT381	6,717	7,575	9,342	7,175	6,783	6,817	6,910
KAT382	6,783	8,875	8,175	6,725	6,767	6,783	6,717
Kontrol +	16,47						
Kontrol -	0						

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa semua isolat bakteri asam laktat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* pada semua waktu fermentasi. Isolat KAT372 dipilih untuk dikarakterisasi dengan metode PCR karena isolat KAT372 memiliki nilai rata-rata zona hambat lebih besar dari isolat lainnya serta memiliki rata rata zona hambat paling tinggi setiap harinya terhadap bakteri *Shigellae dysenteriae*.

Amplifikasi DNA isolate KAT372 dengan metode PCR



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Amplifikasi DNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372. Lajur 1: DNA Template, Lajur 2: *DNA Ladder* 1kb

Hasil elektroforesis amplicon pada Gambar 1 menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya fragmen DNA. Panjang fragmen pada hasil elektroforesis berada di kisaran 1500 pasang basa yang berarti intensitas fragmen yang dihasilkan cukup tinggi, ini sesuai dengan panjang Gen 16S rRNA yang memiliki panjang sekitar 1500 pasang basa. Pada penelitian ini sebagai *DNA ladder* digunakan *Bench Top 1kb DNA Ladder*. Amplicon selanjutnya dikirim ke *Eijkman Institute For Molecular Biology* untuk disekuensing.

Sekuensing Gen 16S rRNA dilakukan dari dua arah, yaitu arah *forward* menggunakan primer 27F dan primer 1492R untuk arah *reverse* saat proses PCR. Dalam penelitian ini digunakan program Bioedit untuk mengolah data hasil sekuensing. *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) digunakan untuk membandingkan urutan nukleotida dari asam nukleat dari hasil penelitian dengan sekuens-sekuens DNA dari berbagai penjuru dunia yang telah dipublikasikan dalam database (Nurhikmayani et al., 2015).

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fabifermentans strain DSM 21115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fabifermentans strain LMG 24284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus paraplantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2510	2510	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2507	2507	99%	0.0
<input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2505	2505	99%	0.0

Gambar 2. Deskripsi Hasil *Nucleotide* BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Asam Laktat KAT372 Dari Fermentasi Buah Kakao

Gambar 2 menunjukkan bahwa urutan basa nukleotida dari isolat KAT372 hasil fermentasi buah kakao memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans* dengan nilai *query coverage* sebesar 99%, *Identification* 99%, *max score* 2571, *E value* 0. Persen identitas menunjukkan persen kesamaan basa nukleotida antara isolat yang didapat dengan database *GenBank*. (Drancourt et al., 2000).

PEMBAHASAN

Fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini memiliki keuntungan yaitu dapat meningkatkan jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena buah cacao mengandung nutrisi yang baik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat terutama karbohidrat. Karbohidrat pada saat fermentasi akan terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti asam laktat, asam asetat, asam propionate dan etil alkohol (Sari,

2013). Isolasi bakteri asam laktat diawali dengan melakukan pengenceran bertingkat, hal ini bertujuan mengurangi atau memperkecil jumlah bakteri yang tersuspensi dalam larutan agar tidak terjadi kepadatan bakteri yang ditanam.

Pada uji aktivitas antibakteri sebelum dilakukan uji, kepadatan sel bakteri patogen (T 25%) diukur terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer transmittan pada panjang gelombang 580 nm. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kepadatan sel yang berlebihan pada saat uji aktivitas. Kontrol positif yang digunakan yaitu *ciprofloxacin* karena antibiotik ini merupakan pengobatan pilihan pertama pada penyakit yang disebabkan oleh *shigella* dan merupakan antibiotik spektrum luas (Katzung, 1998). Dari hasil uji aktivitas semua isolat bakteri asam laktat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* pada semua waktu fermentasi. Hal ini disebabkan karena pada umumnya bakteri asam laktat menghasilkan senyawa metabolit primer seperti asam laktat, asam asetat dan hidrogen peroksida pada fase logaritmik (Djide & Sartini, 2008). Metabolit sekunder dari bakteri asam laktat seperti bakteriosin yang terbentuk pada fase stasioner juga berperan penting dalam penghambatan bakteri patogen.

Dibandingkan dengan kontrol positif, zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri *Shigella dysenteriae* oleh isolat BAL memiliki nilai tidak terlalu besar. Hal ini disebabkan karena *Shigellae dysenteriae* memiliki ketahanan terhadap pH asam, dimana salah satu mekanisme antibakteri dari bakteri asam laktat sendiri yaitu menurunkan pH sekitar sehingga bakteri patogen tidak dapat mempertahankan pHnya yang menyebabkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler dari bakteri patogen tersebut (Septiarini et al., 2013).

Dari hasil penyejajaran dengan program BLAST didapatkan urutan basa nukleotida dari isolat KAT372 hasil fermentasi buah kakao memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans* dengan nilai *query coverage* sebesar 99%, *Identification* 99%, *max score* 2571, *E value* 0. Persen identitas menunjukkan persen kesamaan basa nukleotida antara isolat yang didapat dengan database *GenBank*. Nilai *E Value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuens. Nilai *E Value* yang semakin besar menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan nilai *E Value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Pada hasil *nucleotide* BLAST Persen identitas 97% dapat

didefinisikan kemiripannya pada tingkat genus dan persen identitas 99% dapat didefinisikan kemiripannya pada tingkat spesies (Drancourt et al., 2000).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan keenam isolat bakteri asam laktat yang diperoleh memiliki aktivitas antibakteri terhadap *shigella dysenteriae*. Ini membuktikan bahwa isolate bakteri asam laktat yang berasal dari fermentasi kakao merah dapat dijadikan sumber baru sebagai antibakteri alami yang bermanfaat bagi kesehatan terutama yang memiliki masalah pencernaan.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 6 isolat bakteri asam laktat dari fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*) beraktivitas antibakteri dengan isolat KAT372 yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Shigella dysenteriae* dan diidentifikasi sebagai *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115 dengan kemiripan 99%. Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen lain dan uji aktivitas lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA Tahun Anggaran 2020-2021.

REFERENSI

- Amezquita, A., Brashears, M. M. (2002). Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready to Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria. *Journal Food Protection*, **65**(2), 316-325
- Djide, M. N., Sartini. (2008). Isolasi, Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Kol (*Brassica oleracea* L.) dan Potensinya sebagai Antagonis *Vibrio harveyi* *In Vitro*. *Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin*. **18**(3): 211-216.
- Drancourt, M., Bollet, C., Martelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D. (2000). 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of A Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(10), 3623-3630.
- Ibrahim, A., Fridayanti, A., Delvia, F. (2015). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, **1**(2), 8-13.
- Jianbo, J., Young, S. K., Jin, Q., Eom, H. J., Han, N. S. (2008). Diversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Takju Korean Rice Wine. Cheongju. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**(10), 1678-1682

Karmawati, E., Mahmud, Z., Syakir, M., Munarso, S. J., Ardana, I. K., Rubiyo. (2010). *Budidaya dan Pascapanen Kakao*. Puslitbang Perkebunan. Bogor. Hlm. 10-16

Katzung, G. B. (1998). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi 6. Terjemahan: Agoes A, Chaidir J, Munaf S, Tanzil S, Kamaludin MT, Nattadipura S, Leilani Y, Aziz S, Theodorus. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hlm. 772-773.

Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetika*. Edisi 2. IPB Press. Bogor. Hlm. 6- 31

Nurhikmayani, R., Rosana, A., Zaraswati, D. (2015). Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Itik Pedaging *Anas domesticus* dengan Gen 16s rRNA. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin. Makassar.

Promega Corporation. (2014). *Wizard Genomic DNA Purification Kit*. USA

Rahman, D. H., Tanzaha, I., Usmiati, S. (2012). Formulasi Produk Susu Fermentasi Kering dengan Penambahan Bakteri Probiotik *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium longum*. *Jurnal Gizi dan Pangan*, **7**(1), 49-54.

Rinanda, T. (2011). Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, **11**(3), 172-177.

Sari, Y. N. M., Syukur, S., Jamsari. (2013). Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). *Jurnal Kimia Unand*, **2**(2), 81-91

Sharah, A., Karnila, R., Desmelati. (2015). Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Ikan Peda Kembung (*Rastrelliger sp.*). *Jurnal Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau*, **15**(1), 168-175.

Septiarini, W. E., Padaga, M. C., Oktaviane, D. A. (2013). Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Diisolasi dari Feses Orangutan (*Pongo pygmaeus*) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Enterik Patogen Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, **13**(11), 127-133

Setiarto, R. H. B., Jenie, B. S. L., Faridah, D. N., Saskiawan, I., Sulistiani. (2015). Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil Amilase dan Pululanase dan Aplikasinya pada Fermentasi Talas. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **26**(1), 80- 89.

Warisno., Dahana, K. (2009). *Inspirasi Usaha Membuat Aneka Nata*. PT Agro Media Pustaka. Jakarta. Hlm. 5.

