



UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA FAKULTAS FARMASI DAN SAINS

Islamic Center, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur 13460 Telp. (021) 8611070, Fax. (021) 86603233

www.uhamka.ac.id, www.ffa.uhamka.ac.id, Email: ffa@uhamka.ac.id

SURAT TUGAS

NOMOR: 178 /F.03.01/2023

Pimpinan Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka dengan ini memberi tugas kepada :

- Nama : **Fitri Yuniarti, M.Si.**
- Jabatan : Dosen FFS UHAMKA
- Alamat : Islamic Center Jl. Delima Raya II/ IV, Perumnas Klender – Jakarta Timur
- Tugas : Sebagai Penulis pada **Jurnal AL-Kaunyah: "SKRINING ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI BUAH KAKAO MERAH (THEOBROMA CACAO L. VARIETAS CRIOLLO) TERHADAP BAKTERI SHIGELLA DYSENTERIAE"**
- Waktu : Semester GENAP TA. 2022/2023
- Lain-lain : Setelah melaksanakan tugas agar memberikan laporan kepada Dekan atau sama yang memberi tugas.

Demikian surat tugas ini diberikan untuk dilaksanakan dengan sebaik-baiknya sebagai amanah dan ibadah kepada Allah Subhanahu Wata`ala

Jakarta, 07 Maret 2023

Dekan

Dr. Apt. Hadi Sunaryo, M.Si.



**SKRINING ANTIBAKTERI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR
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*, Wahyu Hidayati, Fitriani, Audina Sarah

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

*Corresponding author: fitri_yuniarti@uhamka.ac.id

Naskah Diterima: 18 Oktober 2020; Direvisi: 20 Februari 2021; Disetujui: 28 Maret 2021

Abstrak

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan Indonesia yang berperan sebagai habitat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme yang baik. Salah satu bakteri yang dapat tumbuh dikomoditas tersebut yakni Bakteri Asam Laktat (BAL) yang berguna untuk kesehatan pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat BAL yang memiliki aktivitas antibakteri tinggi terhadap *Shigella dysenteriae* dari fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*). Skrining antibakteri terhadap *S. dysenteriae* dilakukan dengan metode difusi cakram dan BAL yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi selanjutnya dilakukan identifikasi molekular dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sepasang primer 27F dan 1492R digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA BAL dan dilanjutkan dengan sekuensing. Identifikasi hasil sekuensing dilakukan dengan penyejajaran data pada program BLAST. Hasil Penelitian menemukan isolat KAT372 merupakan isolat yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dari 6 isolat yang ditemukan pada fermentasi buah kakao merah. Isolat ini memiliki kemiripan 99% terhadap *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115. Isolat BAL dari fermentasi buah kakao merah dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibakteri alami terhadap *S. dysenteriae*.

Kata kunci: Antibakteri; Bakteri asam laktat; Kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*); PCR; *Shigella dysenteriae*; Sumber daya alam

Abstract

Cacao is one of Indonesia's plantation commodities and is a natural resource that has an important role as a habitat for the growth and development of various good microorganisms. One of them is Lactic Acid Bacteria (LAB), which is good bacteria for digestive health. This study aims to obtain LAB isolates that have high antibacterial activity against Shigella dysenteriae from fermented red cacao fruit (Theobroma cacao L. criollo variety). Antibacterial screening against Shigella dysenteriae was carried out using the disc diffusion method and LAB which had the highest antibacterial activity followed by molecular identification with the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. A pair of 27F and 1492R primers were used for amplification of the 16S rRNA BAL gene and continued with sequencing. The identification of sequencing results was carried out by aligning the data in the BLAST program. The results found that KAT372 isolate was the isolate that had the highest antibacterial activity of the 6 isolates found in the fermentation of red cacao fruit. This isolate has 99% similarity to Lactobacillus fabifermentans strain DSM 21115. LAB isolate from fermented red cacao fruit can be used as a source of natural antibacterial against S. dysenteriae in maintaining digestive health later.

Keywords: Antibacterial; Cacao red (*Theobroma cacao* L. *criollo* variety); Lactic acid bacteria; Natural resources; PCR; *Shigella dysenteriae*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i1.17817>

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan berbagai sumber daya alam. Berbagai jenis tumbuhan menghasilkan buah yang memiliki peranan cukup penting, sebagai habitat untuk tumbuh dan berkembangnya berbagai mikroorganisme yang baik. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu mikroorganisme yang baik untuk kesehatan pencernaan.

Penelitian tentang isolasi BAL untuk kesehatan telah banyak dilakukan, terutama yang diisolasi dari produk daging dan susu, baik yang mentah maupun kalengan. Namun, masih sedikit informasi mengenai isolat BAL yang berasal dari buah-buahan dan sayur-sayuran, terutama buah dan sayuran lokal. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan sayuran merupakan sumber BAL yang potensial, seperti durian, nanas, sirsak, kakao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, dan kacang panjang (Sari et al., 2013). Salah satu tumbuhan yang merupakan sumber isolat BAL adalah kakao (*Theobroma cacao*. L), yang terdiri tiga kelompok besar, yaitu *Criollo*, *Forastero*, dan *Trinitario*.

Kakao jenis *criollo* (kakao merah) dinilai merupakan kakao yang terbaik, termasuk kakao mulia dan memiliki mutu serta cita rasa khas (Karmawati et al., 2010). Kakao ini memiliki aerasi yang rendah, sehingga menyediakan kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan BAL. Selain itu, kandungan gula pada daging buah kakao cukup tinggi, yaitu 10–15% yang merupakan faktor penting pada proses fermentasi (Warisno & Dahana, 2009). Bakteri asam laktat ini akan berkembang biak secara spontan selama fermentasi karena lingkungan hidup yang sesuai untuk pertumbuhannya (Sharah et al., 2015).

Keberadaan BAL dalam kakao, yang merupakan bakteri probiotik, dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen. BAL menghasilkan beberapa komponen antimikroba, seperti asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita & Brashears, 2002), sehingga BAL dalam kakao berpotensi meningkatkan mikroflora usus yang berperan dalam mengoptimalkan kondisi kesehatan tubuh (Rahman et al., 2012).

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit disentri. Bakteri ini dapat menyebabkan gangguan pencernaan yang serius. Oleh karena itu, bakteri patogen ini cocok untuk dijadikan sebagai bakteri uji aktivitas antibakteri dari BAL dalam kakao.

Salah satu cara untuk mengetahui isolat yang diperoleh merupakan spesies BAL dapat dilakukan dengan cara karakterisasi molekuler, seperti dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR ini merupakan metode enzimatik yang berguna untuk melipatgandakan sekuens nukleotida secara *in vitro* (Muladno, 2010). Teknik PCR banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisa genetika, yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas tinggi seperti dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA memiliki daerah hypervariable region, yakni daerah yang menjadi ciri khas mikroorganisme. Analisis sekuensing gen ini dapat memperoleh sekuens yang khas dari mikroorganisme. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi dan teknologi, karena analisis sekuensing gen ini dinilai cepat dan akurat untuk mengidentifikasi bakteri (Rinanda, 2011).

Bakteri Asam Laktat memiliki kemampuan aktivitas antibakteri, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pemanfaatan kemampuan tersebut, seperti mengujicobanya ke bakteri *S. dysenteriae*. Karakterisasi molekuler BAL dari fermentasi buah kakao merah dilakukan dengan teknik PCR. BAL dipenelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai antibakteri alami terhadap *S. dysenteriae*.

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 g 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 72 jam (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 de *ManRogosa Sharpe Broth* (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. Suspensi hasil pengenceran bakteri diambil 100 μ L, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril yang berisi media de *ManRogosa Sharpe Agar* (MRSB) padat dengan 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 MRSB, setelah itu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Stok kultur diambil dari koloni murni yang tumbuh. Sebanyak 1 ose koloni murni yang tumbuh diambil, kemudian digoreskan secara zig-zag ke dalam media MRSB *slant* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Ibrahim et al., 2015).

Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakterisasi BAL dilakukan dengan identifikasi morfologi secara makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopik yang diamati adalah bentuk, warna, dan ukuran koloni BAL yang tumbuh pada media MRSB. Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1993).

Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri *Shigella dysenteriae* diambil 0,1 mL dari inokulum bakteri menggunakan pipet mikro, kemudian dicampurkan dengan 20 mL *Nutrient Agar* hingga homogen di cawan petri steril, lalu dibiarkan memadat. Media yang telah berisi bakteri uji diletakkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang berisi suspensi bebas sel BAL. Sebagai kontrol positif digunakan kertas cakram yang sudah berisi antibiotik *ciprofloxacin*, sedangkan kontrol negatif menggunakan *aqua destilata*. Semua biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan seperti yang terdapat dalam manual instruksi yang terdapat dalam kit isolasi DNA Promega Corporation (2014). 1 μ L kultur BAL di media MRSB yang telah diinkubasi selama 24 jam dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 μ L, lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000–16.000 rpm. Pelet hasil sentrifugasi diambil, lalu disuspensikan ke dalam 480 μ L EDTA 50 mM. Enzim lisis (*lysozym*) ditambahkan ke dalam pelet sel yang telah tersuspensi dengan total volume 120 μ L. Selanjutnya, secara perlahan dipipet dan dicampurkan.

Sampel diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30–60 menit. Setelah diinkubasi, sampel disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000–16.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet diambil lalu ditambahkan dengan *nuclei lysis solution*, dan dipipet perlahan untuk mendapatkan suspensi sel. Sel yang telah tersuspensi diinkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit untuk melisis sel, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sebanyak 3 μ L RNase ditambahkan pada sel yang telah terlisis dan dikocok 2 hingga 5 kali agar tercampur sempurna, serta dilanjutkan dengan inkubasi selama 15–60 menit pada suhu 37 °C, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Pada sel yang telah ditambah RNase ditambahkan 200 μ L *protein precipitation solution*, lalu 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. Supernatan dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* bersih yang telah berisi isopropanol, kemudian dikocok perlahan hingga benang DNA terlihat. Supernatan disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000–16.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dituang dan *tube* dikeringkan dengan kertas *absorbent* secara hati-hati. Sebanyak 600 μ L etanol suhu ruang ditambahkan, lalu *tube* dibolak-balikkan beberapa kali untuk mencuci pelet. Supernatan disentrifugasi pada 13.000–16.000 rpm selama 2

menit. Supernatan dituang dan *tube* dikeringkan dengan kertas *absorbent*. Pelet dibiarkan kering selama 10–15 menit. Sebanyak 100 μL *DNA rehydration solution* ditambahkan ke dalam *tube* lalu diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalaman. DNA yang dapat disimpan pada suhu 2–8 °C.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dalam *ThermocyclerMupid-Exu* dengan menggunakan primer 27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG untuk arah *forward* dan primer 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT untuk arah *reverse* (Jianbo et al., 2008). Sebanyak 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 dicampurkan ke dalam *microtube* (Promega Corporation, 2014). PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi pradenaturasi 94 °C selama 90 detik, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 50 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C. Setelah selesai, fase akhir (*final*) dilakukan pada suhu 72 °C selama 5 menit (Setiarto et al., 2015).

Elektroforesis Hasil Produk PCR

Sebanyak 10 μL produk PCR ditambahkan dengan 2 μL *DNA Loading Dye* (Thermo Scientific). Elektroforesis dilakukan pada 100 V selama 25 menit dengan menggunakan 1% gel agarosa dalam 1x *Tris Acetate EDTA* (TAE), *DNA Ladder* digunakan sebagai pembanding. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan 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 arah *reverse* menggunakan primer 1492R.

Analisis Data

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan cara melakukan BLAST urutan nukleotida hasil sekuensing 16S rRNA dengan *data base* 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. Sebelum difermentasi, daging buah berwarna putih, tidak berbau, dan rasanya asam. Setelah difermentasi, daging buah menjadi berwarna putih kekuningan, berbau khas, dan rasanya asam-manis seperti tapai.

Tabel 1. Hasil identifikasi morfologi bakteri asam laktat dari kakao merah

Parameter	Kode isolat					
	KAT371	KAT372	KAT373	KAT374	KAT381	KAT382
Warna koloni	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
Bentuk koloni	Bulat, cembung	Bulat, cembung	Bulat, cembung	Bulat, cembung	Bulat, cembung	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

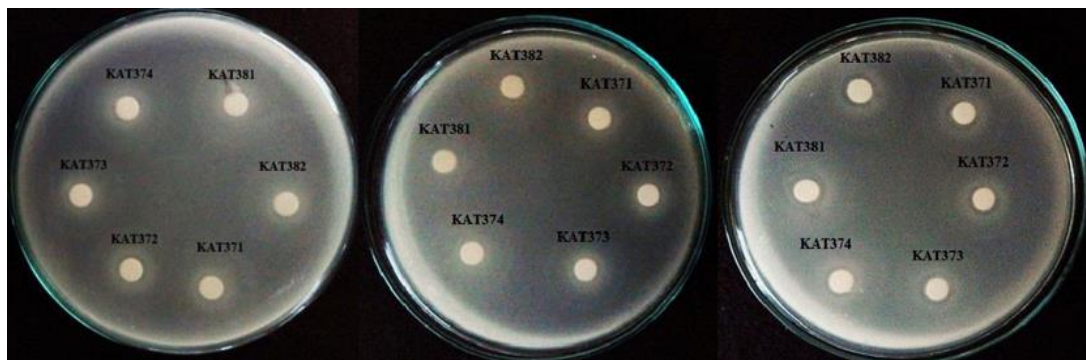
Isolasi BAL yang diawali dengan pengenceran bertingkat 10^{-1} sampai 10^{-9} mendapatkan 6 isolat BAL, yaitu isolat KAT371, KAT372, KAT373, dan KAT374, yang berasal dari pengenceran

10^{-7} , serta isolat KAT381 dan KAT382 yang berasal dari pengenceran 10^{-8} . Stok isolat disimpan untuk pengujian tahap selanjutnya.

Koloni tunggal BAL, yang berbentuk bulat, cembung, licin, dan berwarna putih, diambil untuk diidentifikasi morfologinya. Hasil uji mikroskopis menunjukkan sel berwarna ungu dan berbentuk basil. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas bakteri asam laktat terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*

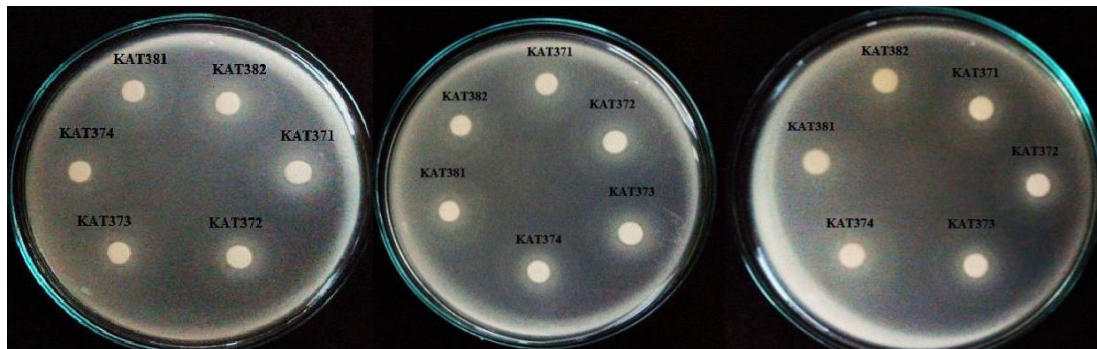
Kode isolat	Hari fermentasi						
	1	2	3	4	5	6	7
	Zona hambat (mm)						
KAT371	7,017	10,125	9,275	8,125	6,717	6,867	7,017
KAT372	7,083	9,267	9,367	8,425	7,233	7,033	7,117
KAT373	6,708	8,558	8,333	7,767	6,700	6,750	6,817
KAT374	6,725	8,075	8,367	6,767	6,717	6,717	6,873
KAT381	6,717	7,575	9,342	7,175	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						



Supernatan hari ke-1

Supernatan hari ke-2

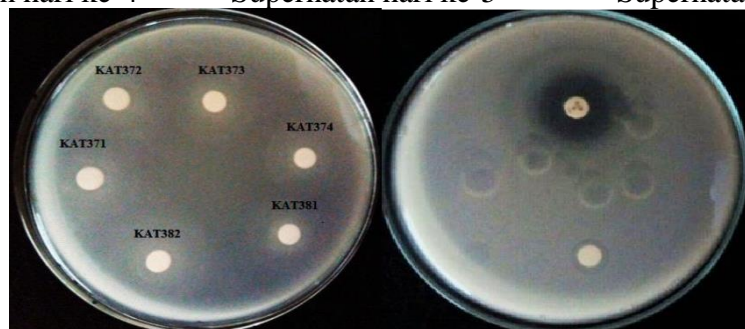
Supernatan hari ke-3



Supernatan hari ke-4

Supernatan hari ke-5

Supernatan hari ke-6



Supernatan hari ke-7

Kontrol positif dan negatif

Gambar 1. Hasil uji antibakteri terhadap bakteri patogen *Shigellae dysenteriae*

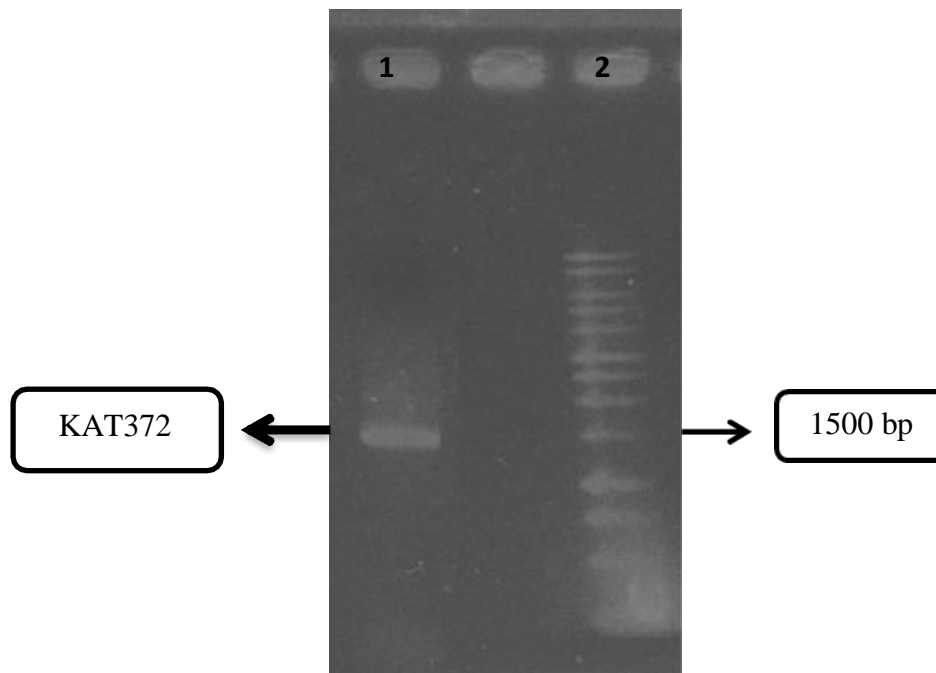
Skrining Aktivitas Antibakteri

Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu bakteri *S. dysenteriae* dan *Ciprofloxacin* digunakan sebagai kontrol positif. Hasil uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghambat *S. dysenteriae* yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar cakram. Hasil uji aktivitas BAL sebagai antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Tabel 2 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa semua isolat bakteri asam laktat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* pada semua waktu fermentasi. Isolat KAT372 menjadi isolat yang dipilih untuk karakterisasi, karena isolat KAT372 memiliki nilai rata-rata zona hambat lebih besar terhadap bakteri *S. dysenteriae* dibandingkan isolat lainnya.

Amplifikasi DNA Isolat KAT372 dengan metode PCR

Penelitian ini menggunakan kit dari promega untuk amplifikasi, yaitu *Go Taq Green Master mix*, untuk primer digunakan primer 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan primer 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). Primer 27F dan 1492R dipilih karena merupakan primer universal yang sering digunakan dalam identifikasi bakteri asam laktat. Hasil PCR kemudian disimpan pada suhu 0 °C untuk menghindari kerusakan. Amplikon selanjutnya dielektroforesis untuk memastikan hasil positif dengan adanya fragmen DNA.



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplifikasi DNA isolat bakteri asam laktat KAT372, yaitu DNA *template* (KAT372) dan DNA *ladder* 1 kb (1500 bp)

Hasil elektroforesis amplikon pada Gambar 2 menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya fragmen DNA. Panjang fragmen pada hasil elektroforesis berada pada 1.500 pasang basa. Hal ini menunjukkan bahwa intensitas fragmen yang dihasilkan cukup tinggi dan sesuai dengan panjang gen 16S rRNA. Pada penelitian ini sebagai DNA *ladder* digunakan *Bench Top* 1 kb DNA *ladder*.

Gambar 3 menunjukkan bahwa urutan basa nukleotida dari isolat KAT372 hasil fermentasi buah kakao memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus fabifermentans*. Adapun nilai *query coverage* sebesar 99%, *Identification* 99%, *max score* 2571, *E value* yang diperoleh sebesar 99%, 99%, 2571, dan 0.

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 3. Deskripsi hasil *nucleotide* BLAST gen 16S rRNA isolat bakteri asam laktat KAT372 dari fermentasi buah kakao

PEMBAHASAN

Fermentasi yang dilakukan pada penelitian dapat meningkatkan jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena buah kakao mengandung nutrisi yang baik untuk pertumbuhan BAL, terutama karbohidrat. Karbohidrat pada saat fermentasi akan terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan etil alkohol (Sari et al., 2013). Isolasi BAL diawali dengan melakukan pengenceran bertingkat, akan memperkecil jumlah bakteri yang tersuspensi dalam larutan agar tidak terjadi kepadatan bakteri saat ditanam pada media agar.

Sebelum uji aktivitas antibakteri, kepadatan sel bakteri patogen (T 25%) diukur terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer transmitan pada panjang gelombang 580 nm, agar tidak terjadi kepadatan sel yang berlebihan pada saat uji aktivitas. Sementara kontrol positif yang digunakan, yaitu *ciprofloxacin* dipilih karena antibiotik ini merupakan pilihan pengobatan pertama pada penyakit yang disebabkan oleh *Shigella* dengan spektrum luas (Katzung, 1998). Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa semua isolat BAL yang diperoleh memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae*. Hal ini, disebabkan pada umumnya bakteri asam laktat menghasilkan senyawa metabolit primer, seperti asam laktat, asam asetat, dan hidrogen peroksida pada fase logaritmik (Djide & Sartini, 2008). Hasil metabolit sekunder dari bakteri asam laktat, seperti bakteriosin, yang terbentuk pada fase stasioner juga berperan penting dalam penghambatan bakteri patogen.

Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri *S. dysenteriae* oleh isolat BAL memiliki nilai tidak terlalu besar dibandingkan dengan kontrol positif (Tabel 2). Hal ini disebabkan *S. dysenteriae* memiliki ketahanan terhadap pH asam, salah satu mekanisme antibakteri dari bakteri asam laktat sendiri yakni menurunkan pH sekitar, sehingga bakteri patogen tidak dapat

mempertahankan pHnya. pH yang menyebabkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler dari bakteri patogen tersebut (Septiarini et al., 2013).

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 pada *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 antarsekuens semakin rendah, sedangkan nilai *E Value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antarsekuens semakin tinggi. Hasil *nucleotide* BLAST yang menunjukkan nilai persen identitas 97% mendefinisikan bahwa mikroorganisme memiliki kemiripan pada tingkat genus dan nilai persen identitas 99% mendefinisikan bahwa mikroorganisme memiliki kemiripan pada tingkat spesies (Drancourt et al., 2000).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keenam isolat bakteri asam laktat yang diperoleh memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae*. Hal ini membuktikan bahwa isolat bakteri asam laktat yang berasal dari fermentasi kakao merah dapat dijadikan sumber baru sebagai antibakteri alami yang bermanfaat bagi kesehatan saluran pencernaan.

SIMPULAN DAN SARAN

Hasil Isolasi BAL dari fermentasi buah kakao merah (*Theobroma cacao* L. varietas *criollo*) memperoleh 6 isolat BAL dengan isolat KAT372 sebagai BAL dengan aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Shigella dysenteriae*. Hasil identifikasi molekular menunjukkan bahwa isolat KAT372 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fabifermentans* strain DSM 21115 dengan kemiripan 99%. Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya juga dilakukan uji aktivitas BAL ini terhadap bakteri patogen lain serta 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. doi: 10.4315/0362-028x-65.2.316.
- 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. doi: 10.5402/2012/916845.
- 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. doi: 10.1128/JCM.38.10.3623-3630.2000.
- Hadioetomo, R. S. (1993). *Mikrobiologi dasar dalam praktek*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- 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. doi: 10.51352/jim.v1i2.29.
- 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*. Bogor: Puslitbang Perkebunan.

- Katzung, G. B. (1998). *Farmakologi dasar dan klinik edisi 6* (A. Agoes, J. Chaidir, S. Munaf, S. Tanzil, M. T. Kamaludin, S. Nattadipura, Y. Leilani, S. Aziz, & Theodorus, Terjemahan). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Muladno. (2010). *Teknologi rekayasa genetika edisi 2*. Bogor: IPB Press.
- Promega Corporation. (2014). *Wizard genomic DNA purification kit*. Wisconsin. USA
- Rahman, D. H., 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. doi: 10.25182/jgp.2012.7.1.50-.
- 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., Sasakiawan, 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. doi: 10.6066/jtip.2015.26.1.80.
- Warisno., & Dahana, K. (2009). *Inspirasi usaha membuat aneka nata*. Jakarta: PT Agro Media Pustaka.