



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
DENGAN GEN 16S rRNA PENGHASIL ENZIM PROTEASE YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI
MARKISA KUNING (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) DI
SUMATERA BARAT**

TESIS



**HABIBI HIDAYAT
0921207027**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

**Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) Dengan Gen 16S rRNA
Penghasil Enzim Protease Dan Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari
Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*)
Di Sumatera Barat**

Oleh : Habibi Hidayat

(Dibawah bimbingan Prof. Dr. Sumaryati Syukur dan Prof. Dr. Abdi Dharma)

UNIVERSITAS ANDALAS
RINGKASAN

Pergeseran pola makan masyarakat modern dengan konsumsi bahan makanan yang mengandung protein dan lemak yang tinggi serta kandungan serat yang rendah diduga sebagai salah satu pemicu munculnya berbagai penyakit yang berhubungan dengan saluran pencernaan. Modifikasi komposisi bakteri saluran pencernaan dapat dilakukan melalui konsumsi bakteri hidup sehingga dapat menjaga keseimbangan bakteri yang menguntungkan di dalam saluran pencernaan. Bakteri asam laktat (BAL) termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe (GRAS)* yang disebut bakteri probiotik. Enzim pencernaan ekstraseluler yang dihasilkan dapat membantu proses pencernaan pada manusia seperti enzim protease. Salah satu keragaman hayati yang dapat menghasilkan mikroorganisme potensial sebagai penghasil enzim protease berasal dari buah Markisa (*Passiflora sp.*).

Mengingat manfaat dan kandungan buah markisa bagi kesehatan sangat penting, salah satunya untuk sistem pencernaan maka peneliti perlu melakukan

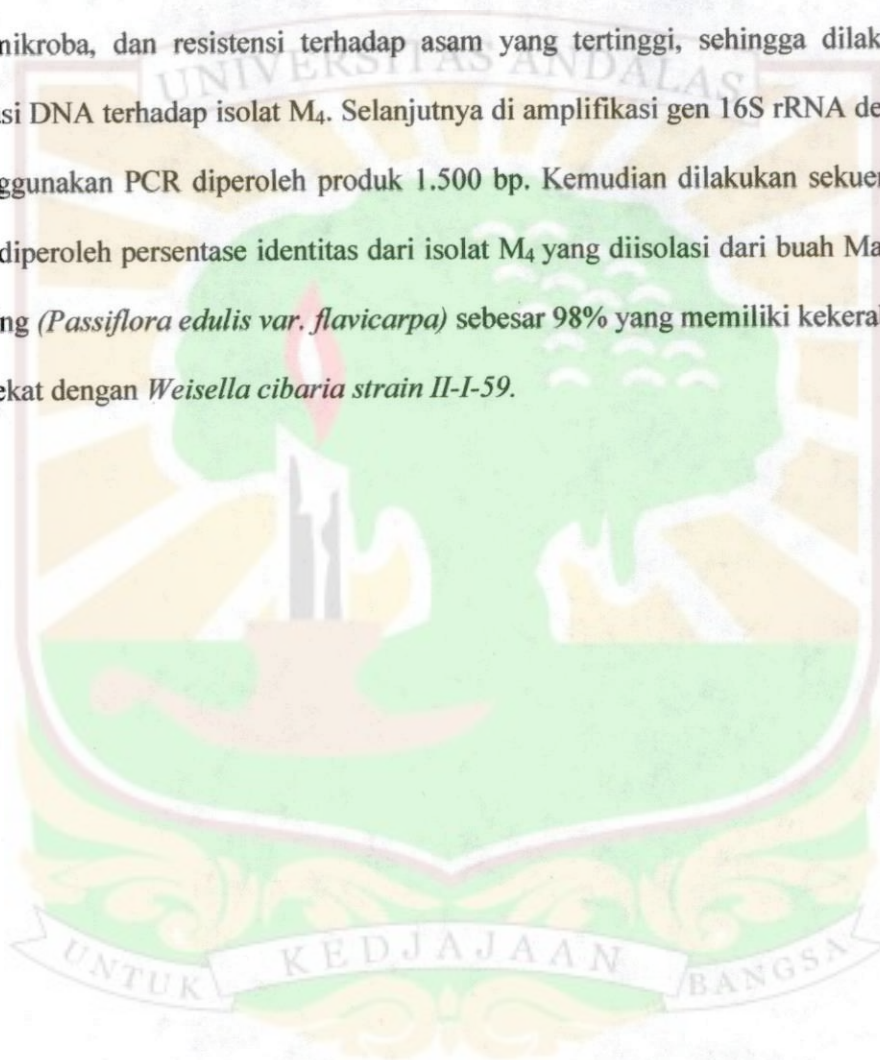
penelitian untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial dari buah Markisa kuning untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim protease, sehingga dapat membantu sistem pencernaan manusia yang meliputi uji aktivitas enzim protease, uji potensi probiotik, dan karakterisasi molekuler yang berasal dari sampel Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) dengan judul “Karakterisasi molekuler bakteri asam laktat (BAL) dengan gen 16S rRNA penghasil enzim protease yang berpotensi sebagai probiotik dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) di Sumatera Barat.

Karakterisasi molekuler bakteri asam laktat (BAL) dengan gen 16S rRNA penghasil enzim protease yang berpotensi sebagai probiotik dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) di Sumatera Barat telah dilakukan di laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, serta laboratorium Biokimia Universitas Andalas dari bulan September sampai dengan Desember 2010. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi molekuler gen 16S rRNA enzim protease dari bakteri asam laktat (BAL) yang dapat membantu kesehatan manusia khususnya sistem pencernaan manusia.

Dari hasil pengamatan keenam isolat menunjukkan aktivitas enzim protease dan aktivitas antimikroba serta resistensi terhadap asam dalam media. Tiga isolat dipilih untuk dilakukan uji selanjutnya berdasarkan diameter zona bening. Dari metode screening isolat M₄ menunjukkan aktivitas enzim yang tertinggi, yaitu sebesar 6,5, M₁ sebesar 6, dan M₂ sebesar 5,75. Sedangkan dengan menggunakan metode spektrofotometer diperoleh kadar protein dari persamaan regresi untuk masing-masing sampel M₁, M₂, dan M₄ sebesar 0,65023 mg/mL, 0,58854 mg/mL, 0,65943 mg/mL. Sedangkan aktivitas enzim yang

diperoleh 0,72567 Unit/mL, 0,6553 Unit/mL, dan 0,8626 Unit/mL. Aktivitas enzim spesifik yang dihasilkan sebesar 1,11594 Unit/mg, 1,1134 Unit/mg, dan 1,3081 Unit/mg.

Hasil uji aktivitas antimikroba dan resistensi terhadap asam isolat M₁, M₂, dan M₄ menunjukkan aktivitas yang tinggi berdasarkan diameter zona bening. Isolat M₄ merupakan isolat unggul karena memiliki aktivitas enzim, aktivitas antimikroba, dan resistensi terhadap asam yang tertinggi, sehingga dilakukan isolasi DNA terhadap isolat M₄. Selanjutnya di amplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan PCR diperoleh produk 1.500 bp. Kemudian dilakukan sekuensing dan diperoleh persentase identitas dari isolat M₄ yang diisolasi dari buah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) sebesar 98% yang memiliki kekerabatan terdekat dengan *Weissella cibaria strain II-I-59*.



**KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
DENGAN GEN 16S rRNA PENGHASIL ENZIM PROTEASE YANG
BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI
MARKISA KUNING (*Passiflora edulis var. flavicarpa*)
DI SUMATERA BARAT**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**Judul Tesis :Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL)
Dengan Gen 16S rRNA Penghasil Enzim Protease
Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari Fermentasi
Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) Di
Sumatera Barat**

Nama Mahasiswa : HABIBI HIDAYAT


BP : 0921207027

Program Studi : Kimia

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan di depan sidang panitia ujian akhir Magister Sains pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan lulus pada tanggal 1 Februari 2011.

Menyetujui,

1. Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc

Ketua


Prof. Dr. Abdi Dharma, M.Sc

Anggota

2. Ketua Program Studi Kimia



Dr. H. Diaswir Darwis, MS. DEA

NIP. 19501208 198003 1 001

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. H. Novirman Jamarun, MSc

NIP. 19551106 198003 1 001

Motto dan Persembahan

- Dengan Bismillah aku melangkah menggapai impian dan cita-cita yang telah lama ku impikan.
- Sesungguhnya shafatku, ibadahku, hidupku, dan matiku hanyalah milik Allah SWT.
- Tuhan semesta alam.

- Kreativitas, keuletan, dan kegigihan dalam melakukan pekerjaan diri adalah kunci sukses karya besar orang-orang biasa dalam meluarbiatkan dirinya.
- Keberhasilan seseorang dimulai dari keberaniannya untuk mengambil sikap tegas dalam suatu keputusan.
- Ketiga kita hidup untuk kepentingan pribadi, hidup ini tampak lebih pendek dan cepat.
- Ia bermula saat kita mulai mengerti dan akan berakhir bersama berakhirnya dengan usia kita yang terbatas. Tetapi, apabila kita hidup untuk orang lain yaitu hidup untuk berjua, maka hidup ini terasa panjang dan memiliki makna yang dalam. Ia bermula bersama mulainya kehidupan manusia dan membentang beberapa masa setelah kita berpisah dengan permukan bumi. (Sayid Kusub)

- Aku terhyung dan tertatih-tatih dalam gelap, kucari dan terus kucari cahaya penyjuk.
- Jika, keputusanmu eras eras menghampiri diriku, sejenak aku berhenti engkau, engkau hadir mengingatkanmu tentang kesukses.
- Bangun di fajar subuh.....
- Dengan hati senang awan.....
- Menyukuri baru penuh dengan kectinaan.....
- Istarahat diterk, siang merenungkan.....
- Puncak getaran cinta.....
- Pulang kala senja dengan syukur penuh.....
- Di rongga dada.....
- Kemudian terena dengan doa bagi yang.....
- Terema dalam sanubar.....
- Dan sebuah nyanyian kesyukuran.....
- Tersungging di bibir senyuman.....(Kahlil Gibran)



Persembahan

Sujud syukurku ya...Robb atas limpahan rahmat yang tiada terkira, sehingga aku dapat menyelesaikan perjalanan dalam kampus yang kukira hanya dalam impianku, aku seperti terbangun dari mimpi akhirnya aku dapat menyelesaikan perjalanan ini. Dengan kerendahan hati kupersembahkan karya ini untuk:

- Kedua orang tuaku (ayahanda Sidi Syamsuir dan Ibunda Yusna) yang tangguh, hebat, dan perkasa yang selalu mengigatku dalam setiap doa dan nasihat yang terucap dari hati dan lisannya. Semoga Allah SWT membalas semuanya. Amiin
- Kakak-kakakku : Teta, kak yet, kak dewi, bank winson, kak mul.
kakak iparku : kak tarmen, da yon, da amir, tanga vivin, tanga devi, terima kasih atas dukungan dan semangat yang kalian berikan.
- Special for bank mame'x yang selalu memotivasi dan menanti keberhasilanku. Thanks bank buat semuanya.
- Adek-adekku yang cantik dan imut : ai dan ina yang telah berbagi keceriaan dalam hidup dan selalu mendoakan abank agar sukses. Tetap Banggakan amak dan ayah ya dek,
- Keponakan-keponakanku : Sutra, rian, ari, icha, oyik, dan cayah. Tetap menjadi anak-anak yang sholeh dan solehah, patuh, hormat, dan sayang kepada orang tua.iya (almh) always to be shadowing in my life and my brain.
- Sahabatku yang selalu mendukung aku dikala suka dan duka : Bayu and indra You are my best friend forevever
- Teman-teman seperjuangan (Lactoteam) Biochemistry: Kak Sarah, Kak uul, Kak fit, Kak Ririn, Kak Della. Akhirnya kita bisa kak meski harus melewati halangan dan rintangan yang begitu berat ini.
- Bank dindin and kak elda makasih buat persahabatannya selama ini.
- Chemistry'09 PascaSarjana Universitas Andalas aku bisa karena kalian dan makasih atas semua kerjasamanya selama ini.
- Almamaterku.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan judul "Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) Dengan Gen 16S rRNA Penghasil Enzim Protease Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) Di Sumatera Barat" adalah hasil/karya saya bukan merupakan jiplakan dari hasil/karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini ternyata tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Januari 2011
Yang Membuat Pernyataan,

HABIBI HIDAYAT
0921207027



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 13 April 1987 di Kota Bengkulu Provinsi Bengkulu, sebagai anak ketujuh dari sembilan bersaudara dari pasangan Sidi Syamsuir dan Yusna. Penulis menamatkan Sekolah Dasar pada tahun 1999 di SD Negeri 63 Pasar Minggu, Bengkulu. Penulis melanjutkan pendidikan ke SLTPN 7 Jl. Enggano Kota Bengkulu dan tamat tahun 2002. Kemudian penulis melanjutkan ke SMAN 5 Jl. Cendana Kota Bengkulu dan lulus pada tahun 2005. Setamat SMA Penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Bengkulu jurusan Pendidikan Kimia dan memperoleh gelar sarjana pada bulan April tahun 2009. Pada bulan Agustus tahun 2009 Penulis melanjutkan pendidikan S2 di Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang.



KATA PENGANTAR



Sesungguhnya segala puji hanyalah bagi Allah subhanallahu wa ta'ala karena telah memberikan rahmat dan hidayah-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) Dengan Gen 16S rRNA Penghasil Enzim Protease Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var.flavicarpa*) Di Sumatera Barat”**. Segala pertolongan dan ampunan semoga senantiasa diberikan kepada hamba-NYA. Penulis berlandung kepada Allah *azza wa jalla* dari kejahatan diri dan keburukan amal. Barang siapa yang diberi hidayah maka tidak ada yang mampu menyesatkan dan barangsiapa yang disesatkan oleh Allah *ta'ala* maka tidak ada yang mampu memberikan petunjuk. Shalawat dan salam semoga dilimpahkan kepada Rasulullah *salallahu 'alaihi wassalam*, keluarganya, para sahabatnya, dan siapa saja yang mengikuti petunjuk sampai hari kemudian. Hari yang tiada lagi bermanfaat harta dan anak bagi pemiliknya kecuali bagi mereka yang datang menghadap Tuhannya dengan hati yang ikhlas.

Penulisan tesis ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains pada Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas.

Penyelesaian tesis ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada :

- ❖ Prof.Dr.Sumaryati Syukur, MSc.PhD yang telah membimbing dan memberikan dukungan serta menyumbangkan pikiran dan perhatian yang tulus kepada penulis sehingga menjadi penambah kekuatan bagi penulis untuk menyelesaikan tesis ini.
- ❖ Prof.Dr.Abdi Dharma, MSc.PhD yang telah membimbing dan memberikan masukkan dalam pembuatan tesis ini.
- ❖ Dr.Djaswir Darwis,MS.DEA selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Andalas
- ❖ Prof.Dr.Ir.H.Novirman Jamarun, MSc. selaku direktur Pascasarjana.

- ❖ Kedua orang tua Penulis yang selalu memberikan motivasi baik secara materiil maupun moril.
- ❖ Keluarga penulis yang selalu mendoakan dan memberikan motivasi yang tak ternilai sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.
- ❖ Teman-teman seperjuangan mahasiswa Kimia angkatan '09 Pascasarjana Universitas Andalas.
- ❖ Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu.



DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	i
HALAMAN PERSYARATAN.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN.....	v
MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	vi
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	viii
RIWAYAT HIDUP.....	xi
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Markisa (<i>Passiflora sp.</i>).....	5
2.2. Fermentasi Asam Laktat.....	9
2.3. Bakteri.....	10
2.4. Bakteri Probiotik	11
2.5. Karakteristik Bakteri Asam Laktat (BAL)	14
2.5.1. Homo dan Hetero Fermentatif.....	16
2.6. <i>Lactobacillus sp.</i>	18
2.7. Enzim protease.....	20
2.8. Analisa Gen 16S rRNA.....	21
2.9. Reaksi Berantai <i>Polymerase</i> (PCR).....	24

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1.Tempat dan Waktu Penelitian	28
3.2. Bahan dan Alat.....	28
3.3.Prosedur dan Percobaan Cara Kerja	29
3.3.1. Sampel Percobaan.....	29
3.3.2. Sterilisasi alat yang digunakan	29
3.3.3. Persiapan dan Pembuatan Media	30
3.3.4. Isolasi dan Identifikasi BAL dari Markisa.....	31
3.3.4.1. Isolasi BAL dari Markisa dengan Metode Konvensional	31
3.3.4.2. Identifikasi Morfologi	32
3.3.4.3. Uji aktivitas Enzim Protease.....	33
3.3.4.3.1. <i>Screening</i> Protease.....	33
3.3.4.3.2. Spektrofotometer.....	33
3.3.4.4. Uji Aktivitas Antimikroba	35
3.3.4.5. Resistensi Terhadap Asam.....	36
3.3.4.6. Isolasi DNA.....	37
3.3.4.7. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR.....	37
3.3.4.8. Gel Elektroforesis	38
3.3.4.9. Sekuensing Nukleotida	38

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL).....	39
4.2. Identifikasi BAL.....	41
4.3. Aktivitas Enzim Protease.....	44
4.4. Uji Aktivitas AntiMikroba.....	47
4.5. Resistensi Terhadap Asam.....	53
4.6. Isolasi DNA.....	55
4.7. Amplifikasi Gen 16S rRNA Dengan PCR.....	58
4.8.Sekuensing Nukleotida.....	60

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

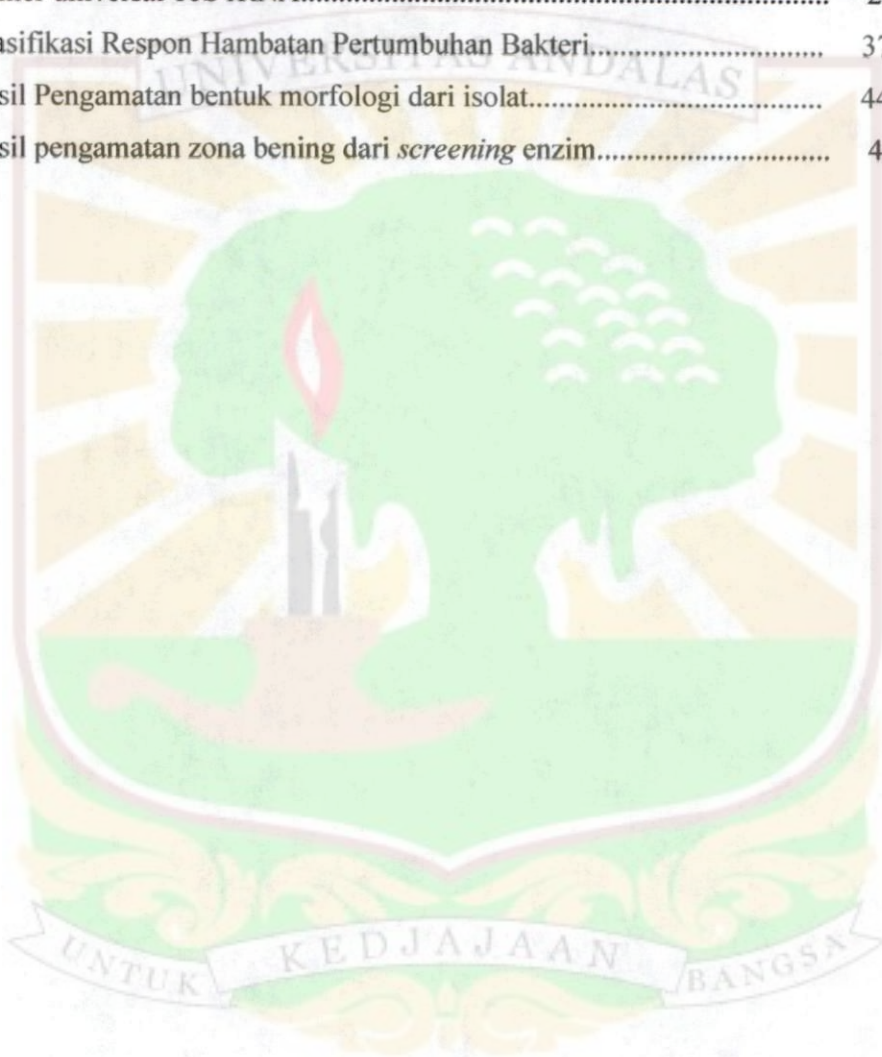
5.1. Kesimpulan..... 63

5.2. Saran..... 63

DAFTAR PUSTAKA 64**LAMPIRAN**..... 65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan karbohidrat dan asam-asam organik buah Markisa.....	6
2. Karakteristik bakteri asam laktat asal tanaman dan susu.....	16
3. Karakteristik 2 sub grup genus <i>Lactobacillus sp.</i>	19
4. Pembagian komposisi Ribosom Prokariot dan Eukariot.....	24
5. Primer universal 16S rRNA.....	24
6. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri.....	37
7. Hasil Pengamatan bentuk morfologi dari isolat.....	44
8. Hasil pengamatan zona bening dari <i>screening</i> enzim.....	46



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pergeseran pola makan masyarakat modern dengan konsumsi bahan makanan yang mengandung protein dan lemak yang tinggi serta kandungan serat yang rendah diduga sebagai salah satu pemicu munculnya berbagai penyakit yang berhubungan dengan saluran pencernaan. Modifikasi komposisi bakteri saluran pencernaan dapat dilakukan melalui konsumsi bakteri hidup sehingga dapat menjaga keseimbangan bakteri yang menguntungkan di dalam saluran pencernaan. Salah satu bakteri yang beredar dipasaran adalah bakteri asam laktat (BAL), khususnya dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Sunjaya, 2008).

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, sehingga disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe (GRAS)* yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan, bahkan beberapa jenis bakteri tersebut berguna bagi kesehatan khususnya dalam membantu proses pencernaan manusia yang disebut bakteri probiotik.

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Menurut Grajek (2005) bakteri probiotik tidak bersifat patogen, secara genetik stabil, dan resisten terhadap enzim pencernaan. Enzim pencernaan

ekstraseluler dan intraseluler yang dihasilkan dapat membantu proses pencernaan pada manusia seperti enzim protease dan laktase (putranto, 2006).

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis dalam sel hidup. Kemajuan dalam teknologi fermentasi, rekayasa genetika dan teknologi aplikasi enzim menyebabkan penggunaan enzim dalam industri semakin meluas. Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, kesehatan, farmasi, dan industri kimia lainnya. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang kesehatan adalah enzim protease. Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3-4 miliar dolar per tahun. 4-5 juta dolar diantaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim. Pasar yang luas dan sumber daya alam yang mendukung merupakan peluang berharga bagi pengembangan industri enzim di negara Indonesia (Kosim, 2010).

Sumber enzim yang paling banyak digunakan berasal dari mikroorganismes, karena lebih menguntungkan jika dibandingkan dengan tanaman maupun hewan. Hal ini disebabkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Adanya mikroorganismes yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalan mikroorganismes indigenous penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia.

Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganismes yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim. Salah satu keragaman hayati yang dapat menghasilkan

mikroorganisme potensial berasal dari buah Markisa (*Passiflora sp.*). Buah Markisa merupakan salah satu komoditas unggulan kabupaten Solok propinsi Sumatera Barat, karena memiliki kandungan gizi yang tinggi serta ekstrak buah markisa banyak mengandung fitokimia yang mampu membunuh sel kanker seperti polifenol dan karotenoid.

Penelitian mengenai bakteri asam laktat (BAL) sebagai penghasil enzim protease telah banyak dilakukan pada berbagai bahan pangan, misalnya makanan fermentasi (Djaafar et al., 1996). Namun, sampai saat ini penelitian karakterisasi molekuler bakteri asam laktat (BAL) sebagai penghasil enzim protease yang bersumber dari buah-buahan belum dilakukan. Padahal diduga buah-buahan merupakan sumber bakteri asam laktat yang potensial karena kandungan karbohidrat sederhana dan asam-asam organiknya yang tinggi. (Sarkono, 2006).

Mengingat manfaat dan kandungan buah markisa bagi kesehatan sangat penting, salah satunya untuk sistem pencernaan maka peneliti perlu melakukan penelitian untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial dari buah Markisa kuning untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim protease, sehingga dapat membantu sistem pencernaan manusia yang meliputi uji aktivitas enzim protease, uji potensi probiotik, dan karakterisasi molekuler yang berasal dari sampel Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) dengan judul “Karakterisasi molekuler bakteri asam laktat (BAL) dengan gen 16S rRNA penghasil enzim protease yang berpotensi sebagai probiotik dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) di Sumatera Barat”.

1.2. Perumusan Masalah

Masih belum digalinya potensi dari buah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) di Indonesia, khususnya di kabupaten Solok sebagai penghasil enzim protease serta jenis bakteri apa saja yang terkandung di dalamnya, sedangkan buah Markisa banyak terdapat di Indonesia, khususnya di kabupaten Solok.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi molekuler gen 16S rRNA enzim protease dari bakteri asam laktat (BAL) yang dapat membantu kesehatan manusia khususnya sistem pencernaan manusia dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) yang berasal dari kabupaten Solok, Sumatera Barat.

1.4. Hipotesis

Bakteri asam laktat (BAL) yang diperoleh dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) diduga mampu menghasilkan enzim protease yang berpotensi sebagai probiotik sehingga dapat bermanfaat bagi kesehatan manusia, terutama dalam membantu proses pencernaan manusia.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, yaitu dapat mengetahui aktivitas dari enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) dan memberikan penambahan yang berarti pada database penelitian tentang bakteri penghasil enzim ekstraseluler dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*), sebagai probiotik yang terdapat di kabupaten Solok, Sumatera Barat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Markisa (*Passiflora sp.*)

Tanaman Markisa bukanlah tanaman asli Indonesia, tetapi merupakan tanaman yang berasal dari luar negeri Amerika Selatan yaitu negara Brasil, yang menyebar sampai ke Indonesia. Markisa tumbuh liar di hutan-hutan basah yang mempunyai ratusan spesies *Passiflora*. Tanaman markisa telah dikembangkan di beberapa propinsi terutama di Sumatera Utara, Sumatera Barat, Lampung dan Sulawesi Selatan. Budidaya markisa dapat dikembangkan dalam pola kemitraan terpadu antara petani baik yang tergabung dalam kelompok tani atau koperasi dengan perusahaan pengolah buah Markisa sebagai perusahaan inti. Peluang pasar buah Markisa dan hasil olahannya sangat besar baik di dalam negeri maupun luar negeri. Di Indonesia terdapat empat jenis Markisa yang dibudidayakan:

1. Markisa Ungu (*Passiflora edulis var. edulis*)
2. Markisa Konyal (*Passiflora lingularis*)
3. Markisa Kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*)
4. Markisa Erbis (*Passiflora quadrangularis*)

Markisa ungu ini banyak dikembangkan di Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan. Tanaman ini dapat tumbuh pada ketinggian 800–1.500 m di atas permukaan laut. Tanaman markisa diperbanyak dengan stek dan teknik sambungan. Sistem rambatan yang dianjurkan adalah dengan tanaman hidup termasuk pucuk bambu tanpa menggunakan kawat.

Berikut adalah taksonomi Klasifikasi ilmiah dari Markisa:

Kerajaan	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Malpighiales</i>
Famili	: <i>Passifloraceae</i>
Genus	: <i>Passiflora</i>
Spesies	: <i>Passiflora edulis</i>

Menurut Sutomo (2010) dalam *Best Tropical Organic Farm Production*, yaitu Markisa memiliki aroma yang sangat kuat dan dapat berwarna kuning atau ungu di bagian kulit luar. Satu buah Markisa mengandung 25 gram serat yang diperlukan oleh tubuh. Buah Markisa merupakan sumber serat untuk membersihkan dinding usus, meningkatkan pencernaan, dan membantu mencegah serangan jantung dan stroke. Hal ini membuat lebih mudah bagi tubuh untuk mencerna makanan dalam jangka panjang, mencegah perkembangan kanker usus besar. Sebuah proses serupa terjadi pada katup jantung, penumpukan lemak dan kolesterol di dalam hati, melindungi tubuh terhadap serangan jantung, dan stroke.

Adapun kandungan dan asam-asam organik dari buah Markisa dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Kandungan karbohidrat dan asam-asam organik buah Markisa

Komponen	Markisa	
	Ungu	Kuning
A. Karbohidrat (%)		
– Fruktosa	33,5	29,4
– Glukosa	37,1	38,1
– Sukrosa	29,4	32,4
B. Asam Organik (meq/100 gr)		
– Asam Sitrat (<i>citrit</i>)	13,1	55,0
– Asam Malat (<i>malic</i>)	3,86	10,55
– Asam Laktat (<i>Lactic</i>)	7,49	0,58

– Asam Malonat (<i>Malonic</i>)	4,95	0,13
– Asam Susinat (<i>Succinic</i>)	2,42	Trace
– Asam Askorbat (<i>Ascorbic</i>)	0,05	0,06

Sumber :

1. Jaghtiani, JH.T Chan Jr and W.S Sakai 1988. *Tropical Fruit Processing*. Academic Press. Inc. San Diego. California USA.
2. Ashurst, P. R 1995 *Food Flavourings Blackie Academic & Professional*. Bishopbriggs, Glasgow, UK.

Penelitian tentang subyek yang mengambil ekstrak markisa untuk penderita asma, batuk, dan TBC. Antioksidan yang ditemukan pada buah Markisa diyakini dapat memblokir histamin, mengurangi alergi dan peradangan, sehingga dapat mengurangi gejala asma. Antioksidan dan flavonoid yang ditemukan dalam buah markisa juga telah ditemukan oleh beberapa peneliti di University of Florida untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Sutomo, 2008).



Gambar 1. Buah Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)

Markisa manis merupakan salah satu komoditas unggulan kabupaten Solok Propinsi Sumbar. Banyak ditanam di lahan kering di Kecamatan Pantai Cermin, Lembah Gumanti, Payung Sekaki, Lembang Jaya, Danau Kembar dan Gunung Talang. Daerah ini merupakan wilayah dataran tinggi dengan ketinggian 900-1.600 mdpl, topografi bergelombang dan berbukit. Curah hujan tinggi (tipe

iklim B), yaitu 2.500-5.250 mm/tahun. Suhu udara 14-28 °C dengan kelembaban 85%. Total jumlah tanaman markisa manis di kabupaten Solok pada tahun 2008 mencapai 1.474.292 batang (\pm 3686 ha) dengan produksi 118.098,50 ton. Pemanfaatan masih terbatas sebagai buah yang dimakan segar. Pemasaran sebagian besar ke Jakarta, Jawa Barat, Riau, Jambi, Medan, dan sebagian kecil di dalam propinsi terutama di sekitar sentra produksi. Karena kawasan sentra produksi markisa manis juga merupakan daerah wisata Danau Kembar yang banyak dikunjungi wisatawan.

Markisa adalah salah satu komoditas buah unggulan Sumatera Barat selain Jeruk, Pepaya dan Pisang khususnya di kabupaten Solok. Produksi Markisa di kabupaten Solok pada tahun 2003 adalah 30.951 ton dan mengalami peningkatan tahun 2004 menjadi 102.110 ton per tahun. Ada tiga kecamatan yang menjadi sentra produksi Markisa di kabupaten Solok, yaitu kecamatan Lembah Gumanti, Lembang Jaya, dan Gunung Talang. Menurut data Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Barat, luas areal tanaman Markisa saat ini diperkirakan sudah melebihi 4000 hektar (Bappeda Kab. Solok, 2004 dalam Harnel).

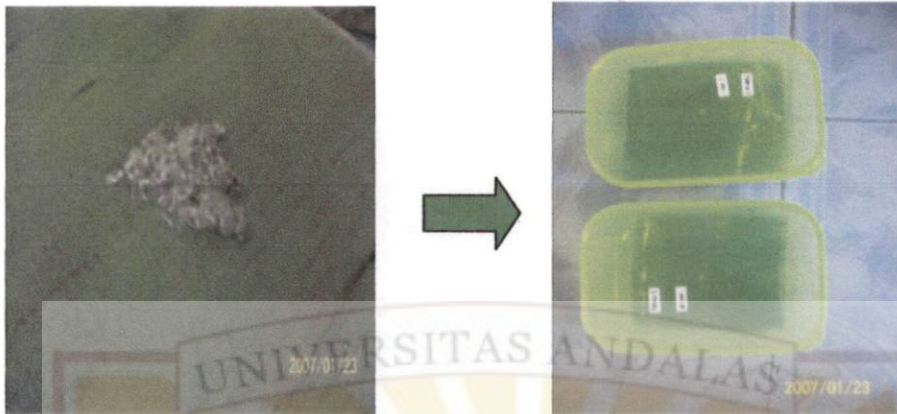
Sekitar 75% produksi Markisa dipasarkan ke beberapa kota di Pulau Jawa, Riau 9%, Jambi 1%, Medan 5% dan sisanya sebesar 10% dipasarkan ke beberapa kota di Sumatera Barat. Pemasaran buah Markisa pada jarak tempuh yang jauh mengakibatkan risiko kerusakan yang tinggi, bahkan mencapai 10%. Kulit Markisa yang rusak mempengaruhi nilai jual. Risiko buah menjadi rusak mencapai sekitar 5%. Untuk menghindari kerusakan maka perlu dicari alternatif pengolahan Markisa. Buah Markisa yang masak dapat diolah menjadi bentuk lain

yang akan mempertinggi nilai jualnya seperti pembuatan sirup, jelly, dan sari buah (Waitlem, 2001 dalam Harnel).

2.2. Fermentasi Asam Laktat

Berbagai jenis makanan fermentasi makanan baik makanan tradisional maupun modern melibatkan bakteri asam laktat (BAL). Secara umum, makanan fermentasi lebih awet dari bentuk segarnya karena kondisi asam tidak disukai oleh bakteri kontaminan. Selama fermentasi produk intermediet yang terbentuk dari katabolisme senyawa organik seperti glukosa berperan sebagai akseptor elektron terakhir menyebabkan terbentuknya senyawa produk akhir fermentasi yang stabil. Sebagai contoh, pada umumnya mikroorganisme mengubah gula menjadi asam piruvat.

Dalam hal ini juga membentuk NHDA dan harus melepaskan elektronnya kepada akseptor jika organisme melakukan metabolisme lebih lanjut. Hal ini dipenuhi dengan cara menggunakan asam piruvat atau beberapa produk dari asam piruvat sebagai akseptor elektron terakhir. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah dengan tidak adanya transfer elektron selama fermentasi ikatan fosfat berenergi tinggi tidak terbentuk melalui fosfolirasi oksidatif melainkan proses yang disebut dengan fosfolirasi subsrat. Dalam hal ini senyawa intermediate dioksidasi, energi yang dilepaskan dikonversi langsung kedalam ikatan yang mengandung energi tinggi (Jurnal: metabolisme bakteri).



Gambar 2. Fermentasi dari Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)

2.3. Bakteri

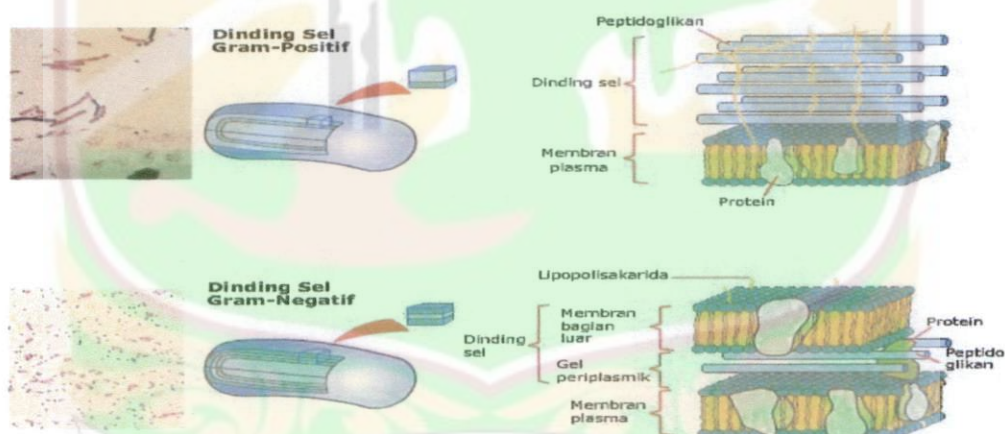
Bakteri adalah protista yang bersifat prokariot yang khas dan bersel tunggal (*uniseluler*). Sel-selnya secara khas membentuk bola (*coccus*), batang (*bacillus*) atau spiral (*spirillum*). Diameternya sekitar 0,5-1,0 μm dan panjangnya 1,5-2,6 μm (Pelczar dan Chan, 1988). Semua bakteri bersel tunggal walaupun dalam beberapa keadaan dapat dijumpai gumpalan yang kelihatan bersel banyak. Bakteri dibagi menjadi tiga bentuk yang utama:

1. Kokus – bulat
2. Basil – berbentuk silinder atau batang
3. Spiral – batang melengkung atau melingkar-lingkar (Fardiaz, 1992).

Berdasarkan komposisi dinding selnya, bakteri dibedakan menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif adalah bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan (molekul yang terdiri dari asam amino dan gula) yang tebal, yaitu antara 20-80 nm dan terdiri atas 60-100 persen peptidoglikan. Tebalnya lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif

menyebabkan bakteri ini tahan terhadap sifat osmosis yang dapat memecah sel bakteri tersebut.

Lapisan peptidoglikan pada bakteri gram negatif lebih tipis dibanding bakteri gram positif dan mengandung lebih sedikit peptidoglikan yaitu 10-20 persen, tetapi mempunyai membran luar yang tebal yang tersusun dari protein, fosfolipida, dan lipopolisakarida sehingga bersama-sama dengan lapisan peptidoglikan, keduanya membentuk mantel pelindung yang kuat untuk sel. Untuk membedakan bakteri gram negatif dan gram positif digunakan pewarnaan gram. gram positif akan memberikan warna ungu, sedangkan bakteri gram negatif akan memberikan warna merah (Pelczar dan Chan, 1988).



Gambar 3. Dinding Sel Bakteri

(E-dukasi.net, 2009)

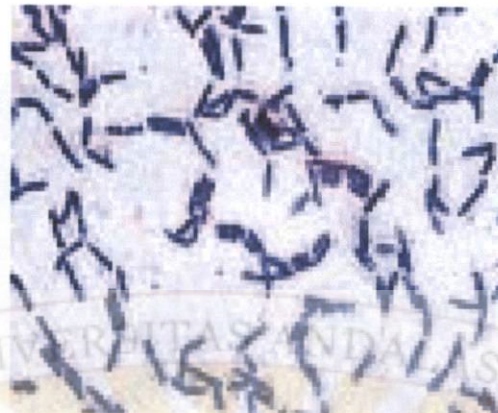
2.4. Bakteri Probiotik

Probiotik berasal dari kata probios yang dalam ilmu biologi berarti kehidupan. Probiotik adalah pangan mengandung mikroorganisme hidup yang secara aktif meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan

flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai. Untuk dapat dikatakan probiotik, maka bakteri tersebut harus memenuhi syarat antara lain: terbukti aman bagi manusia, dapat mencapai usus dalam keadaan hidup, dan terbukti bermanfaat (Fuller, 1992).

Definisi Salminen, dkk (1998) juga menguatkan pentingnya viabilitas probiotik, yaitu preparasi mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan dan efek menyehatkan serta keamanannya harus secara ilmiah teruji pada manusia melalui uji klinis. Saat ini definisi probiotik adalah adanya penekanan dengan jumlah mikroba yang cukup agar memberikan efek positif bagi kesehatan, bisa berkolonisasi sehingga bisa mencapai jumlah tertentu selama waktu tertentu (Surono, 2004).

Probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplementasi makanan. Pemberian probiotik dapat memberikan pengaruh yang menguntungkan bagi kesehatan, yaitu probiotik menghasilkan senyawa-senyawa inhibitor seperti asam laktat dan asam asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam serta H_2O_2 dan bakteriosin yang memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri tersebut serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik terutama dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Syukur, 2006).



Gambar 4. Bakteri probiotik

Tidak semua bakteri baik dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik. Jenis yang dipilih harus mempunyai minimal satu dari karakteristik berikut:

1. Memiliki aktivitas antimikroba

Dalam hal ini, probiotik dapat berperan sebagai antibiotik alami. Beberapa jenis bakteri asam laktat mampu memproduksi asam-asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Senyawa-senyawa ini terutama bakteriosin dapat bersifat patogen terhadap bakteri lain.

2. Resisten terhadap seleksi sistem saluran pencernaan

Seperti asam lambung, cairan empedu, dan getah pankreas. Bakteri tersebut harus memiliki karakteristik ini, karena jika bakteri tidak memiliki karakteristik ini, maka bakteri tersebut akan mati sebelum mencapai usus.

3. Memiliki aktivitas antikarsinogenik

Adanya senyawa karsinogenik seperti nitrosamin yang masuk ke saluran pencernaan, akan dapat dicegah penyerapannya oleh bakteri tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.

4. Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan

Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbangun bersama tinja.

5. Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan usus

Beberapa penyakit seperti diare pada anak-anak dapat terjadi karena kurangnya enzim laktase dalam tubuh, sehingga saluran pencernaan tidak dapat mencerna susu. Bakteri asam laktat dapat menguraikan laktosa dalam susu yang dikonsumsi menjadi monosakarida glukosa dan galaktosa yang mudah dicerna (Syukur, 2006).

2.5. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam laktat dan Bifidobakteria termasuk dalam kelompok bakteri "baik" bagi manusia, dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), yaitu aman bagi manusia. Kelompok bakteri ini tidak membusukkan protein, dan dapat memetabolisme berbagai jenis karbohidrat secara fermentatif menjadi asam laktat sehingga disebut sebagai bakteri asam laktat. Jadi, makanan yang tercemar oleh bakteri asam laktat menjadi rusak karena asam, dan akan menjadi busuk jika kemudian juga dicemari oleh bakteri pembusuk (Surono, 2004).

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang bersifat gram positif, tidak membentuk flora, dan dapat membentuk koki, kokobasili atau batang, katalase negatif, non-motil atau sedikit motil, mikroaerofilik sampai anaerob, toleran terhadap asam, kemoorganotrofik, dan membutuhkan suhu mesofilik (Salminen

dan Von Wright, 1998). Sifat terpenting dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Produksi asam inilah yang pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dan membantu meningkatkan absorpsi mineral (termasuk kalsium). Penurunan absorpsi mineral terjadi akibat gerakan peristaltik usus yang semakin cepat. Namun, tidak semua bakteri asam laktat dapat diklaim sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroba hidup yang memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan manusia.

Beberapa persyaratan agar bakteri asam laktat dapat diklasifikasikan sebagai probiotik adalah: (1) stabil terhadap asam (terutama asam lambung) dan garam empedu, (2) mampu bertahan hidup selama berada pada bagian atas usus halus, (3) dapat memproduksi senyawa antimikroba, (4) mampu menempel dan mengolonisasi sel manusia, (5) tumbuh baik dan berkembang dalam saluran pencernaan, (6) aman digunakan oleh manusia, serta (7) mampu membentuk lingkungan mikroflora yang normal dan seimbang. Beberapa jenis bakteri asam laktat yang sering digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*.

Bakteri asam laktat mempunyai banyak klaim kesehatan. Selain mempertahankan imunitas dan mencegah penggunaan antibiotik, bakteri asam laktat juga mempunyai manfaat lain, seperti mencegah kanker kolon, memperbaiki metabolisme lemak, mengurangi kadar kolesterol darah, memperbaiki pencernaan, dan stimulasi gastrointestinal. Bakteri ini juga dapat

menekan senyawa beracun hasil metabolisme lemak dan protein serta hasil pemecahan enzim tertentu, sehingga mengurangi kerja hati.

Produk fermentasi nabati yang melibatkan bakteri asam laktat diantaranya adalah pickel buah dan sayuran, sauerkraut, kimchi, minuman beralkohol, produk fermentasi kedelai seperti tauco, miso, tempe, produk roti seperti idly sejenis roti di india. Sedangkan produk fermentasi susu yang sudah dikenal diantaranya yogurt, keju, yakult, kefir, dadih, dahi, koumis, dan lain-lain (Surono, 2004).

Tabel 2. Karakteristik bakteri asam laktat asal tanaman dan susu

Karakteristik	BAL asal tanaman	Bal asal susu
Habitat sumber gula	Tanaman glukosa,fruktosa,sukrosa, maltosa, selobiosa	Susu Laktosa
Konsentrasi gula	Tinggi atau rendah	Stabil
Asam amino/ vitamin	Sedikit	Banyak, seimbang
Senyawa penghambat	Asam tanat, alkaloid, tiosianat	Tidak ada
Ko-eksistensi	Khamir, bakteri anaerobik	Tidak ada

Sumber : Sanae Okada, 2003

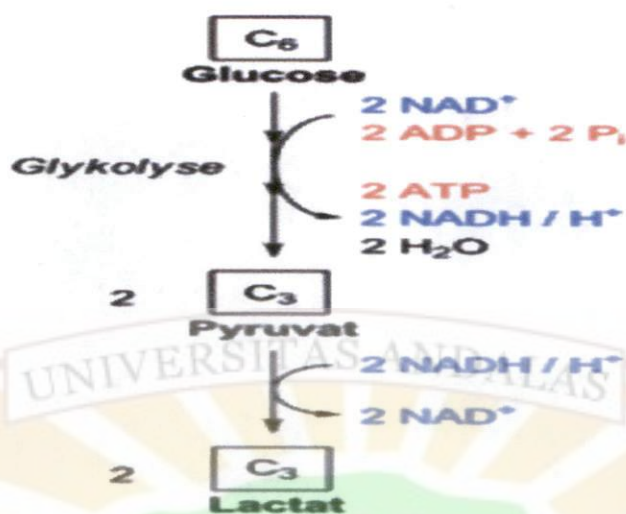
Beberapa bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan bakteriosin, suatu eptida yang bersifat antibakteri, toksin yang berupa protein yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri sejenis. Kriteria bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri gram positif menurut Tagg, dkk (1976), yaitu suatu jenis protein yang bersifat bakterisida tidak hanya bakteriostatik (membunuh bakteri bukan hanya menghambat, sebagai akibat lemahnya *proton motive force* dan hilangnya kemampuan potensi membran), mencegah pertumbuhan bakteri sejenis, dan mempunyai tempat pelekatan yng spesifik bagi patogen, yang membedakannya dengan senyawa antimikroba lainnya.

Bakteriosin dihasilkan oleh bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif mengandung 30 sampai 60 asam amino dengan aktivitas yang bervariasi dari spektrum sempit sampai luas dalam melawan bakteri gram positif lain bahkan ada yang bereaksi dengan bakteri gram negatif (Jack dkk, 1995). Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut : (1) molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel, (2) proses kontak ini mampu mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat, dan (3) ketidakstabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap *proton motive force* (PMF).

2.5.1. Homo dan Hetero Fermentatif

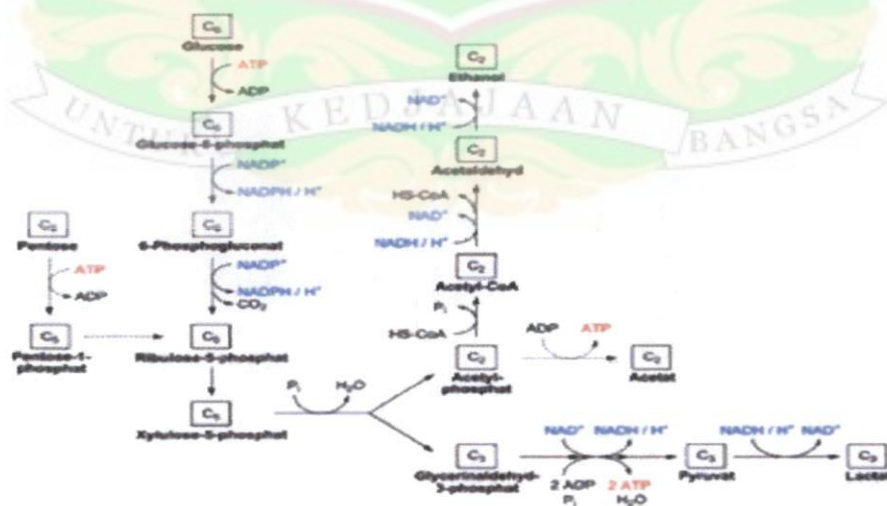
Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam dua grup, yaitu Homofermentatif dan heterofermentatif.

1. Bakteri asam laktat homofermentatif melibatkan jalur *Embden Meyerhof*, yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO₂ dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak daripada bakteri asam laktat heterofermentatif. Secara umum, bakteri asam laktat homofermentatif digunakan dalam fermentasi susu menjadi yogurt, dan juga untuk menghasilkan asam laktat sebagai asidulan dalam industri makanan dan industri polilaktat suatu industri polimer atau plastik ramah lingkungan.



Gambar 5. Diagram Homofermentatif

2. Bakteri asam laktat heterofermentatif, melalui 6-fosfoglukonat/ fosfoketolase selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol, CO₂, asam asetat, senyawa citarasa, dan mannitol serta 1 mol ATP dari heksosa dan tidak mempunyai enzim aldose. Bakteri asam laktat heterofermentatif banyak dimanfaatkan dalam industri susu untuk menghasilkan keju dan senyawa flavour, senyawa citarasa maupun pengental, yaitu eksopolisakarida (Surono, 2004).



Gambar 6. Diagram Heterofermentatif

Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan elektron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus *Lactobacillus* terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi dua sub grup (Tabel 3), kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya (Kandler & Weiss 1986).

Tabel 3. Karakteristik dua sub grup genus *Lactobacillus* sp.

Karakteristik	Spesies
<p>Homofermentatif : Produksi utama asam laktat (>85% dari glukosa) Tidak menghasilkan gas dari glukosa, mempunyai enzim aldose, tidak mempunyai fosfoketolase. (1) tumbuh pada 45°C tetapi tidak pada 15°C, sel berbentuk batang panjang. (2) tumbuh pada 15°C beberapa tumbuh pada 45°C. batang pendek, mempunyai aldose dan fosfoketolase. Fakultatif heterofermentatif.</p>	<p><i>L.acidophilus</i> <i>L.salivarius</i> <i>L.helveticus</i> <i>L.delbrueckii</i> <i>L.casei</i> <i>L.Plantarum</i> <i>L.curvatus</i></p>
<p>Heterofermentatif : Menghasilkan kira-kira 50% asam laktat dari glukosa, menghasilkan CO₂ dan etanol, tidak mempunyai enzim aldolase, mempunyai fosfoketolase, berbentuk batang panjang dan pendek.</p>	<p><i>L.fermentum</i> <i>L.reuteri</i>, <i>L.Brevis</i> <i>L.buchneri</i> <i>L.kefir</i></p>

Sumber : Sharpe (1981); kandler dan Weiss (1986)

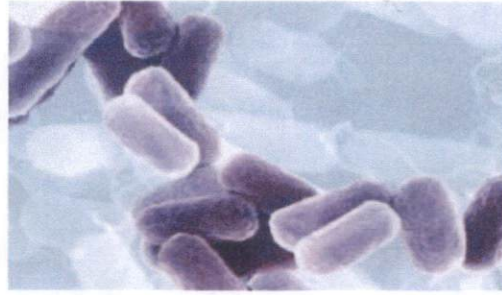
2.6. *Lactobacillus* sp.

Lactobacillus adalah genus bakteri gram-positif, anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik. Genus bakteri ini membentuk sebagian besar dari kelompok bakteri asam laktat, dinamakan demikian karena kebanyakan anggotanya dapat merubah laktosa dan gula lainnya menjadi asam laktat. Kebanyakan dari bakteri ini umum dan tidak berbahaya bagi kesehatan. Pada manusia, bakteri ini dapat

ditemukan di dalam vagina dan sistem pencernaan, di mana mereka bersimbiosis dan merupakan sebagian kecil dari flora usus. Banyak spesies dari *Lactobacillus* memiliki kemampuan membusukkan materi tanaman yang sangat baik. Produksi asam laktat membuat lingkungannya bersifat asam dan mengganggu pertumbuhan beberapa bakteri merugikan. Beberapa anggota genus ini telah memiliki genom sendiri.

Lactobacillus sp. merupakan anggota dari BAL homofermentatif dengan temperatur optimal yang lebih rendah dari 37°C, memiliki ciri; berbentuk batang, tergolong gram positif, tidak membentuk spora, tidak menunjukkan aktivitas katalase dan anaerobik fakultatif, dapat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat dan mampu memproduksi asam laktat. Spesies dalam jenis ini banyak yang dapat mensintesis vitamin sehingga digunakan dalam analisis vitamin, dan banyak yang bersifat termodurik, yaitu tahan suhu pasteurisasi.

Dalam keadaan asam, *Lactobacillus sp.* memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Pertumbuhan *Lactobacillus sp.* dapat menghambat kontaminasi dari mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu BAL dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. *Lactobacillus sp.* juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin yang berfungsi sebagai zat antibiotik (Rostini, 2007).



Gambar 7. *Lactobacillus sp.*

2.7. Enzim Protease

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup. Sebagai protein, enzim memiliki sifat-sifat umum protein, seperti enzim terdenaturasi pada suhu tinggi atau kondisi ekstrim lainnya. Beberapa oksidator, keadaan polaritas larutan, tekanan osmotik yang abnormal juga dapat menghambat kerja enzim (Pakpahan, 2009).

Protease merupakan enzim proteolitik yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi asam-asam amino. Enzim protease salah satu enzim penting yang digunakan secara luas pada aplikasi industri melalui reaksi sintesis dan reaksi hidrolisis. Menurut Huang (2006) penggunaan enzim protease pada beberapa aplikasi industri seperti deterjen, farmasi, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan, dan proses pengolahan limbah industri, hampir mencapai 65 % dari total penjualan enzim di dunia.

Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel. Tetapi, tidak semua bakteri yang mempunyai enzim protease ekstraseluler. Menurut Pakpahan (2009) hidrolisis ikatan peptida adalah reaksi penambahan dan

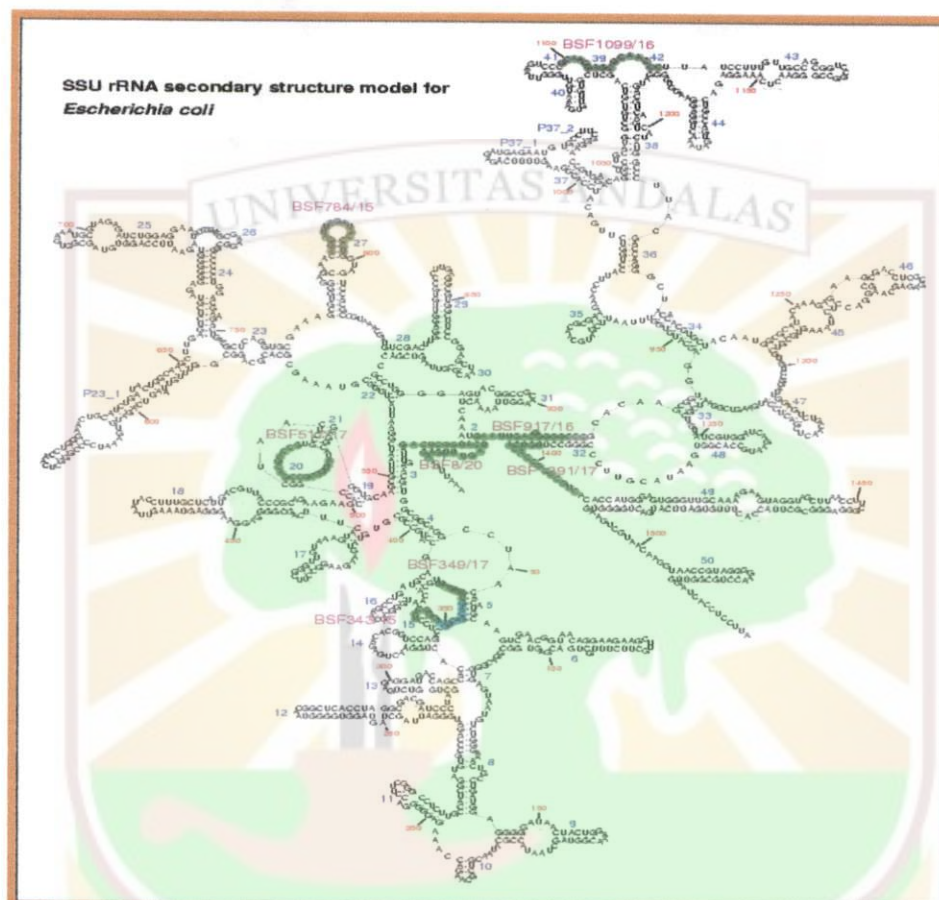
penghilangan , dimana protease bertindak sebagai nukleofilik atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air. Secara umum nukleofilik membentuk intermediet tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air. Pada protease tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk. Intermediet tetrahedral kedua akhirnya dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton, dan enzim bebas yang diregenerasi.

2.8. Analisa Gen 16S rRNA

Karakterisasi biologi molekuler telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri termofilik dan mesofilik. Sejak tahun 1980-an, sekuensing gen 16S rRNA telah digunakan untuk analisa filogenetik dan klasifikasi bakteri. Gen 16S rRNA mengandung daerah konservatif yang ada pada setiap organisme dan dapat digunakan untuk mendesain primer, PCR ataupun untuk sekuensing. Gen ini selalu mengandung daerah-daerah spesifik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Oleh karena itu, analisa sekuens gen 16S rRNA menjadi teknologi ampuh untuk identifikasi isolat bakteri dalam diagnosa penyakit manusia. Metoda ini juga digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisa isolat-isolat bakteri lainnya yang ada di alam (Cai Hugh et. al, 2003).

Gen 16S rRNA terletak pada small sub unit (SSU) ribosom (Gambar 8). Peran penting yang dimiliki oleh 16S rRNA dalam proses translasi merupakan alasan utama penggunaannya sebagai kronometer molekuler. Perubahan struktur dan urutan rRNA dapat menyebabkan suatu organisme sulit melakukan translasi

dan gagalnya produksi protein, maka rRNA menunjukkan derajat konsistensi yang tinggi (Octarya, 2009).



Gambar 8. Gen Ribosomal RNA (GreenGenes.LBL.JGI)

Gen 16S rRNA telah digunakan secara luas untuk mengidentifikasi spesies bakteri, hal ini dapat diketahui dari adanya ketidaksamaan dari dua buah sekuens pada spesies yang sama. Dari beberapa referensi, kesamaan sekuens 99-99,5% menunjukkan spesies yang identik dibandingkan dengan isolat yang mempunyai kesamaan sekuens kecil dari 97% yang berarti telah berbeda taksonominya. Untuk mendapatkan sekuens gen 16S rRNA digunakan primer universal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA pada sel bakteri (Fox GE et.al, 1992).

Tabel 4. Pembagian Komposisi Ribosom Prokariot dan Eukariot

Sumber ribosom	Ukuran ribosom	Sub unit kecil	Sub unit besar
E. Coli	70S	30S, 16S RNA 21 protein	50S, 23S, dan 5S RNA 31 protein
Sitoplasma tikus	80S	40S, 18S RNA 33 protein	60S, 28S, 5,8S dan 5S RNAs 49 protein

Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1.540 bp sedangkan teknologi sekarang ini bisa membaca lebih dari 500-700 bp setiap reaksi. Oleh karena itu, dibutuhkan sekitar enam reaksi pada tiap arah untuk menghasilkan sekuens yang akurat. DNA bakteri dapat diekstrak dengan menggunakan reagen ekstraksi DNA, kemudian gen 16S rRNA dan primer universal diamplifikasi dengan PCR. Produk PCR disekuensing dengan *automatic sequencer* dengan menggunakan primer universal (tabel 5). Sekuens yang diperoleh diolah menjadi sekuens konsensus dengan menggunakan *DNA sequence analyzing software*. Untuk analisa penyejajaran sekuens dibandingkan dengan yang telah ada pada GenBank of National Center for Biotechnology Information (NCBI) dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dan *Multiple-Alignment Analysis* yang dapat diakses secara bebas lewat internet (Jamsari, 2007).

Tabel 5. Primer Universal 16S rRNA

No	Primer	Sekuens (5'-3')
1	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
2	518R	GWATTACCGCGGCKGCTGGCAC
3	530F	GTGCCAGCMGCCGCGG
4	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
5	926F	AACTYAAAKGAATTGACGG
6	1114F	GCAACGAGCGCAACCC

7	1392R	ACGGGCGGTGTGTRC
8	1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC

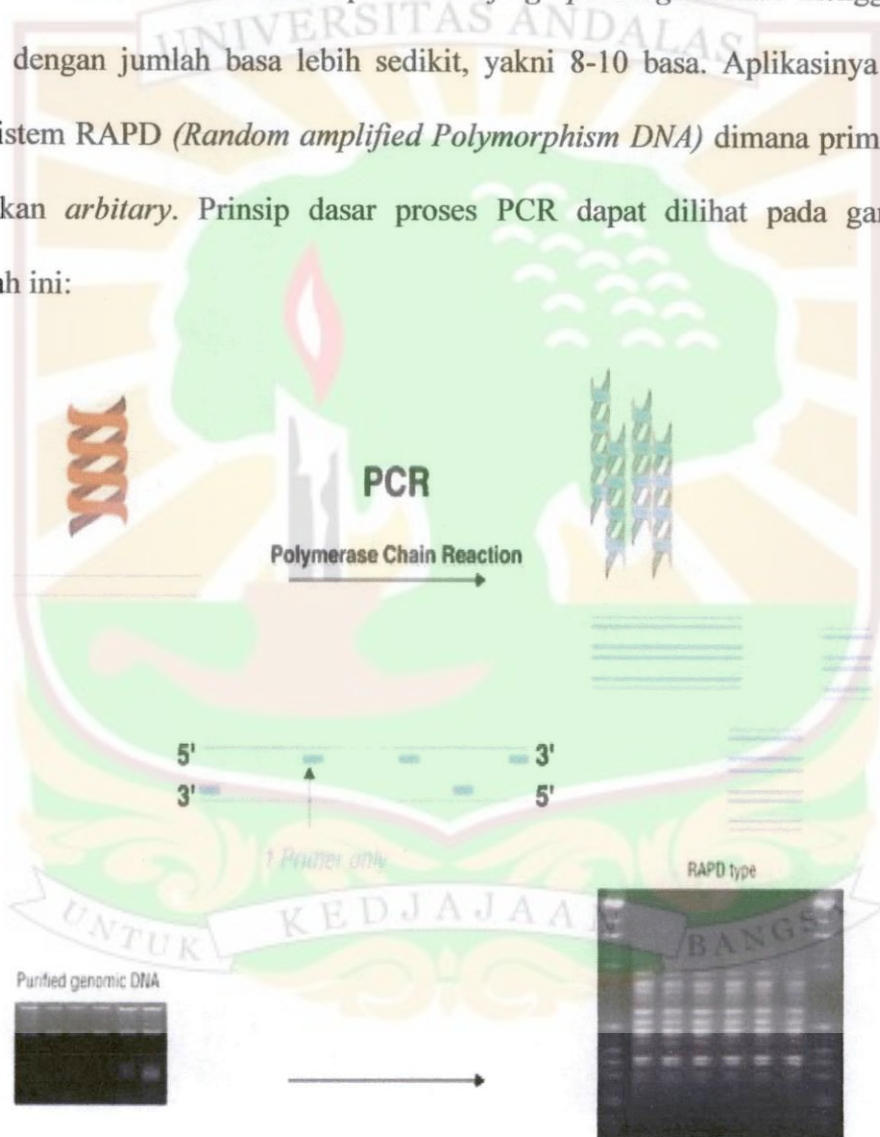
Keterangan: M=C:A, Y=C:T, K=G:T, R=A:G, W=A:T, 1:1

Kriteria yang digunakan untuk analisa ini adalah; untuk identifikasi level spesies adalah $\geq 99\%$ similarity dan untuk identifikasi level genus adalah $\geq 97\%$ dari perbandingan sekuens gen 16S rRNA yang diperoleh dengan sekuens yang ada pada GenBank database. Jika sekuens gen 16S rRNA mempunyai kesamaan dengan dua atau lebih dengan sekuens yang ada pada GenBank database, maka isolate yang baru itu tidak teridentifikasi pada level spesies dengan 16S rRNA *gene sequence Analysis* (Octarya, 2009).

2.9. Reaksi Berantai Polymerase (PCR)

Reaksi berantai polymerase (*PCR = polymerase chain reaction*) ditemukan pertama kali oleh Kary Mullis pada tahun 1984. Hasil penemuan ini menyebabkan Kary Mullis memperoleh hadiah nobel, mengingat sangat revolusinernya hasil penemuan tersebut bagi perkembangan molekular biologi. Perkembangan PCR selanjutnya dipacu oleh adanya penemuan enzim polymerase yang diekstraksi dari bakteri *Thermus Aquaticus* oleh David Gelfant dan Susanne Stoffel. Enzim tersebut sekarang dikenal dengan nama komersial *Taq polymerase*. Pemanfaatan PCR saat ini sudah tidak bisa lagi dilepaskan dari kebutuhan penelitian, baik yang bersifat penelitian dasar sampai kepada bidang kedokteran forensik untuk pembuktian orisinalitas dan kekerabatan melalui teknik *DNA fingerprinting* (Jamsari 2007).

Reaksi berantai polimerase (*PCR = polymerase chain reaction*) memiliki prinsip dasar yaitu sebagai perbanyak molekul-molekul spesifik DNA dengan bantuan primer-primer berupa oligonukleotida secara *in vitro*. Oligonukleotida adalah sekuen nukleotida yang biasanya terdiri dari 15-35 basa nukleotida dan disintesis secara buatan. Beberapa sistem *fingerprinting* bahkan menggunakan primer dengan jumlah basa lebih sedikit, yakni 8-10 basa. Aplikasinya seperti pada sistem RAPD (*Random amplified Polymorphism DNA*) dimana primer yang digunakan *arbitrary*. Prinsip dasar proses PCR dapat dilihat pada gambar 9 dibawah ini:



Gambar 9. Proses Amplifikasi DNA secara *in-vitro* dengan menggunakan mesin PCR (*polymerase chain reaction*).

Untuk pelaksanaan proses PCR tersebut material yang dibutuhkan adalah :

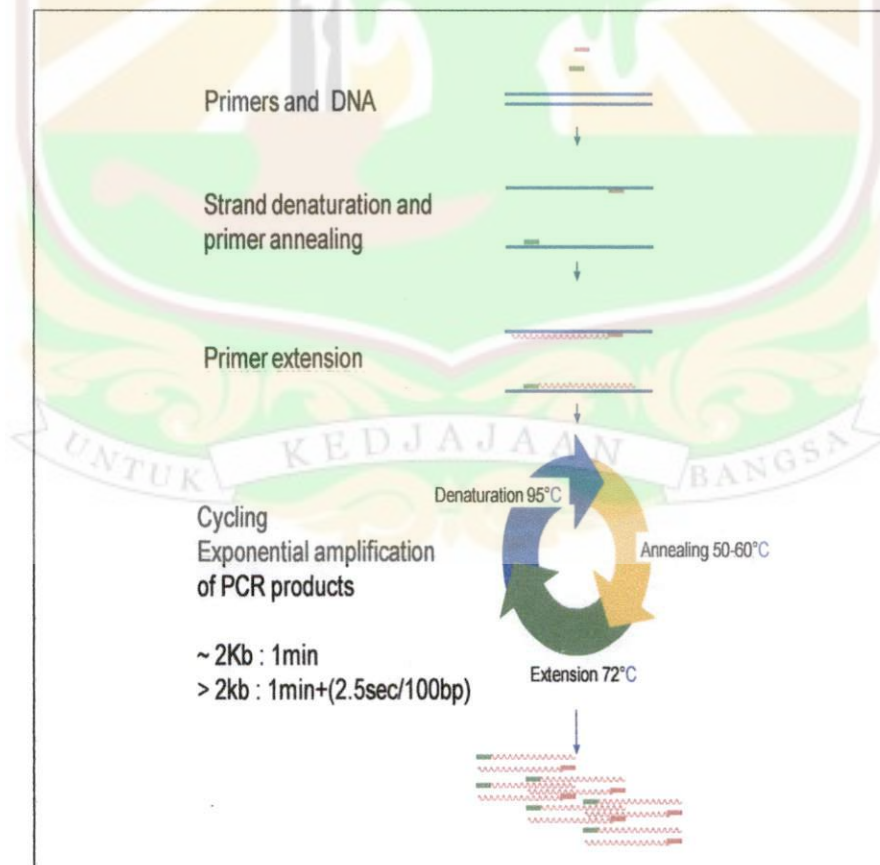
- 1) Template, yaitu molekul DNA yang akan dianalisis. Molekul ini berfungsi sebagai template pembentukan molekul DNA selanjutnya.
- 2) Primer berupa oligonukleotid yang didesain berkomplemen dengan rantai DNA template dan menjadi titik batas multiplikasi segmen DNA target.
- 3) Enzim DNA polymerase yang akan mensintesis sekuens DNA baru dengan menggunakan nukleotid-nukleotid bebas yang terdapat pada larutan reaksi.
- 4) Larutan buffer yang mengandung garam magnesium chlorida ($MgCl_2$). Ion magnesium dibutuhkan sebagai kofaktor enzim *DNA polymerase*.
- 5) Deoksinukleotid (dNTPs): deoxyNucleotida TriPhosphates (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP).

Secara ringkas, prinsip pelipatgandaan jumlah molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR dapat dijelaskan sebagai berikut. Pada suhu $95^{\circ}C$, molekul DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Pada suhu berkisar antara $50^{\circ}C$ sampai dengan $60^{\circ}C$, primer *forward* yang urutan nukleotidanya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer *reverse* akan menempel pada untai tunggal yang lainnya. Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing-masing, enzim *polymerase* mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung $3'$ masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu $72^{\circ}C$. Proses ini juga disebut sebagai ekstensi. Dengan demikian satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Setelah itu, diulang lagi proses denaturasi, penempelan dan sintesis pada suhu tersebut di atas dan seterusnya. Proses dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Suhu denaturasi

dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing pada 95°C dan 72°C, sedangkan suhu penempelan bergantung pada panjang-pendeknya primer. Proses PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus (Octarya, 2009).

Salah satu kondisi proses PCR yang digunakan oleh Abdelnasser (2007) untuk mengamplifikasi DNA bakteri termofilik dengan menggunakan primer posisi nomor 9-27 dan posisi nomor 1542-1525 pada 16S rRNA E.coli dikelompokkan dalam tiga tahap:

- Denaturasi template (95°C) selama 10 menit.
- *Annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai tunggal DNA target 60°C selama 1 menit.
- *Extension* (pemanjangan) yaitu polimerisasi dengan bantuan *Taq-Polymerase* (72°C), 2 menit.



Gambar 10. Siklus Reaksi PCR

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, serta laboratorium Biokimia Universitas Andalas. Penelitian dilakukan mulai dari bulan September sampai dengan Desember 2010.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*), MRS agar (Merck), MRS broth (Merck), Nutrien agar (Himedia, India), larutan NaCl 0,85 %, HCl, NaOH, aquadest, media MH (Mueller-Hinton), media LB (Luria-Bertani), bakteri uji (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*), kasein, susu skim (Indomilk), tirosin, TCA, reagen Follin, buffer fosfat, glyserol, MgSO₄, Tris pH 8, aquabidest (ddH₂O), buffer 1 x TE (Tris EDTA), SDS 10 %, proteinase K (10 mg/μl), phenol:chloroform (24:24), NaCOOH 3 M, isopropanol, etanol 70 %, agar premium, buffer 0,5 x TBE (Tris-Boric-EDTA), ethidium bromide, 10 x BPB (Bromo Phenol Blue), primer, spritus, safranin, iodin, kristal violet, deoksinukleotida (dNTPs), dan Taq polymerase.

3.2.2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, *laminar air flow cabinet*, cawan petri, botol reagent, botol media, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, jarum ose, pipet tetes, bunsen, magnetic stirer dan hot plate,

colony counter, vortex, tabung eppendorf 1,5 dan 2 ml, pipet mikro, tip mikro, mesin PCR, elektroforesis, sentrifuge, gel dokumentasi, heater block, spatula, oven, desikator, shaker, kertas saring, timbangan analitik, kertas label, kertas wrap, botol sampel steril, termometer, pH meter, kaca arloji, gelas ukur, petridish, sisir (comb), hoki stik, shakerwaterbath (Julabo Sw22), freezer, waterbath (Griffin), inkubator (Fisher), rotary shaker, mikroskop lanjutan, stopwatch, kamera digital, dan Spektrofotometer.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Sampel Percobaan

Sampel percobaan yang digunakan pada penelitian ini berasal dari buah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavacarpa*) yang telah difermentasi. Fermentasi markisa ini dilakukan dengan cara markisa yang telah diperoleh dari kabupaten Solok, dikupas dan diletakkan pada daun pisang yang telah disterilkan lalu ditutup rapat-rapat. Selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah (*tupper wear*) yang telah diberi lubang dibiarkan selama 36 jam.

3.3.2 Sterilisasi Alat yang Digunakan

Sterilisasi alat yang akan digunakan dapat dilakukan dengan cara semua alat gelas, eppendrof, pipet mikro, petridish, dan alat-alat lainnya yang akan digunakan dimasukkan kedalam plastik kaca kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 75 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan membakarnya di atas pembakar bunsen hingga membara, dibiarkan sebentar baru kemudian digunakan untuk setiap kali penggunaannya.

3.3.3 Persiapan dan Pembuatan Media

1. Pembuatan Media MRS broth (Merck)

Sebanyak 55,15 gram bubuk MRS Broth ditimbang kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit.

2. Pembuatan Media MRS agar (Merck)

Sebanyak 62,8 gram bubuk MRS agar ditimbang kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 2000 mL lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam petridish steril sebanyak 15 mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

3. Pembuatan Media Pepton water 10 % (Bacto)

Sebanyak 10 gram Pepton water ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 2000 mL dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai larut, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 0,9 mL dan sterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb, selama 15 menit.

4. Pembuatan Media Nutrient agar (Merck)

Sebanyak 28 gram Nutrien Agar ditimbang kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai homogen kemudian disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama

15 menit, selanjutnya dituang dalam petridish steril sebanyak 15 mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

3.3.4. Isolasi dan Identifikasi BAL dari Fermentasi Markisa

3.3.4.1. Isolasi BAL dari Markisa dengan Metode Konvensional.

Proses isolasi BAL dari markisa diawali dengan proses *enrichment*, dimana 5 mL sampel dicampurkan ke dalam 45 mL MRS Broth (Merck), lalu dihomogenkan sehingga didapatkan pengenceran 1:9 atau 10^{-1} kemudian dimasukkan ke dalam jar anaerobik dan di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah inkubasi, sampel diencerkan menggunakan pepton water yang berada di dalam tabung eppendorf melalui proses pengenceran (*serial dilution*) sampai 10^{-7} dengan cara diambil 100 μL dari *enrichmen* atau 10^{-1} lalu ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 900 μL Pepton Water (Bacto) sehingga didapat pengenceran 10^{-2} , selanjutnya diambil 100 μL dari pengenceran 10^{-2} ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 900 μL Pepton water (bacto) sehingga didapatkan pengenceran 10^{-3} dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-7} .

Kemudian proses planting di mana diambil 100 μL dari tabung eppendorf pada pengenceran 10^{-7} lalu ditanamkan pada medium MRS agar (Merck), kemudian dimasukkan dalam jar anaerobik dan di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni BAL tunggal yang tumbuh dipindahkan kembali ke dalam media MRS agar (Merck), secara gores kemudian dimasukkan

dalam desikator dan di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam untuk pemurnian dan identifikasi morfologi BAL akan dilakukan pewarnaan gram (Syukur, 2005).

3.3.4.2. Identifikasi Morfologi BAL

Kegiatan identifikasi morfologi BAL dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopis yang diamati adalah bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni BAL yang tumbuh pada medium MRS agar sedangkan identifikasi mikroskopik yaitu bentuk sel, dan identifikasi fisiologis dengan uji gram.

Prosedur uji gram dimulai dengan pemberian pewarna basa, kristal violet. Larutan iodine kemudian ditambahkan. Semua bakteri akan diwarnai biru pada fase ini. Sel kemudian diberi alkohol. Sel gram positif akan tetap mengikat senyawa kristal violet-iodine, tetap berwarna biru, sel gram negatif warnanya hilang oleh alkohol. Sebagai langkah terakhir, *counterstain* (misalnya safranin pewarna merah) ditambahkan, sehingga sel gram negatif yang tidak berwarna, akan mengambil warna merah; sedangkan sel gram positif terlihat dalam warna ungu (Unus, 2005).

3.3.4.3. Uji Aktivitas Enzim Protease

Untuk uji aktivitas enzim protease ini dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan screening enzim protease dan spektrofotometer.

3.3.4.3.1. Screening enzim protease

Masing-masing kultur murni bakteri asam laktat (BAL) yang diperoleh ditanam dengan metode streak ke dalam medium nutrisi agar yang mengandung susu skim 1% yang didapat dengan cara melarutkan 1,8 gram nutrisi agar dengan

aquadest kemudian ditambah susu skim sebanyak 0,18 gr. Lalu dipanaskan dengan suhu 121°C , setelah dingin lalu dituang kedalam petridish dan tunggu sampai mengeras. Setelah keras lakukan penanaman bakteri pada media dengan cara ditotolkan pada permukaannya. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari atau 72 jam, Lalu diamati zona bening yang terbentuk.

3.3.4.2. Spektrofotometer

Untuk uji aktivitas enzim dengan metoda spektrofotometer mempunyai beberapa tahap kerja, Sebelum melakukan uji enzim terlebih dahulu dilakukan produksi enzim dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan, kemudian diinokulasikan kedalam media cair yaitu MRS Broth 6 mL. Isolat tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, maka supernatan yang didapatkan merupakan ekstrak enzim kasar yang akan digunakan untuk penentuan selanjutnya.

a. Menentukan kadar protein enzim proteolitik

Sebanyak 2 mL Ekstrak Enzim Kasar ditambahkan 5 mL pereaksi C lalu diaduk dengan cepat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. kemudian ditambah 1 mL pereaksi D, lalu vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Ukur adsorbannya pada panjang gelombang 578 nm.

b. Pembuatan Kurva standar BSA

Larutkan BSA (*Bovine Serum Albumine*) kedalam aquades dengan konsentrasi 0 – 500 ppm. Lalu masing-masing diambil 1 mL dan masukkan kedalam tabung reaksi. Tambah 5 mL pereaksi C, inkubasi 10 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambah 0,5 mL pereaksi D. Vortex, dan inkubasi 10 menit pada suhu ruang kemudian ukur absorbannya pada panjang gelombang 578 nm.

c. Penentuan Aktivitas protease dengan metoda Walter (1984)

Buffer posfat 0,05 M dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi masing-masing blanko, standar, sampel. Kemudian ditambahkan substrat kasein 2% sebanyak 4 mL pada tabung standar dan sampel, sedangkan pada tabung blanko ditambah aquades sebanyak 0,1 mL, tabung sampel ditambah crude enzim 2 mL, tabung reaksi standar ditambah tirosin 5 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian divortex dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi ditambah 5 mL TCA 0,1 M pada masing-masing tabung. Kemudian pada tabung sampel ditambah aquades 0,1 mL sedangkan pada tabung blanko ditambahkan crude enzim 2 mL, lalu divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah inkubasi lalu disentrifuse kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Ambil masing-masing filtrat 2 mL dan dipindahkan ketabung reaksi yang baru. Lalu tambahkan NaOH 4 mL kepada masing-masing tabung dan fenol folin atau pereaksi D sebanyak 1 mL. Ketiga tabung reaksi divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian ukur absorbansinya pada panjang

gelombang 275 nm. Untuk menentukan unit aktivitas permenit per mL enzim, digunakan rumus perhitungan aktivitas protease sebagai berikut :

$$U = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times \frac{1}{T} \times 5\mu\text{g/mL}$$

Keterangan : U = Unit Aktivitas permenit per mL enzim

Asp = Nilai absorbansi sampel

Abl = Nilai absorbansi blanko

Ast = Nilai absorbansi standar

T = Waktu inkubasi (menit)

3.3.4.4. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap empat bakteri uji yaitu *E.coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*. Metoda yang digunakan adalah difusi sumur agar. Di mana 3 ml kultur BAL disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya digunakan untuk uji aktivitas antimikroba. Dimasukkan 200 μl bakteri uji masing-masingnya ke dalam 20 ml media NA yang masih cair suhu berkisar antara 40⁰C. Dituang kedalam petridish steril. Dibiarkan selama 30 menit agar mengeras. Kemudian NA agar dilubangi menggunakan tip biru sehingga membentuk sumur. Kedalam sumur dimasukkan 20 μl supernatant BAL, diinkubasi pada suhu 37⁰C secara anaerob. Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke 24, 48 dan 72 jam (Mustopa, 2009).

Menurut Suriawiria dalam Mardiana (2007) pengukuran kekuatan antibiotik-antibakteri dengan menggunakan metode Davis Stout dapat dibagi dalam beberapa kategori yang dapat dilihat pada tabel dibawah ini, yaitu :

Tabel 6. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat kuat

3.3.4.5. Uji Resistensi Terhadap Asam

Pengujian resistensi terhadap asam ini dilakukan pada beberapa variasi pH MRS Broth yaitu pH 2 ; 3; 4 ; 5 ; dan 6. Ditumbuhkan isolat yang mempunyai zona bening tertinggi pada MRS Broth pH 2 – 6. Diinkubasi overnight pada suhu 37⁰C. Kultur yang terbentuk kemudian disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Dilakukan uji antimikroba dengan metoda difusi agar well seperti dijelaskan pada prosedur di atas (Mustopa, 2009).

3.3.4.6. Isolasi DNA

Isolat BAL yang telah dikultur dalam medium cair MRS kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendrof 2 mL steril dan disentrifuse dengan kecepatan 14.000 rpmselama 3 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 500 μ l 1 x TE dipipeting. Sebanyak 40 μ l 10 % SDS (50 μ l dH₂O dan 50 μ l 20 % SDS) dan 5 μ l Proteinase-K ditambahkan dan divortex. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 jam. Selanjutnya, ditambahkan PC (Phenol:Chloroform) 500 μ l disentrifuse selama 3 menit dengan

kecepatan 14.000 rpm. Dibuang pellet dan ditransfer supernatant ke tube yang baru. Kemudian ditambahkan Natrium asetat 3 M sebanyak 50 μ l. Ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 300 μ l. Selanjutnya eppendroff di bolak-balik. Disentrifuse selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Sehingga DNA akan terpresipitasi. Selanjutnya, supernatant dibuang dan eppendrof dikeringkan. Pelet DNA yang diperoleh dicuci dengan etanol 70% sebanyak 1ml selama 30 detik. selanjutnya, Supernatant dibuang dan pelet DNA dikeringudarkan dengan posisi tube terbalik. Setelah kering, pelet DNA disuspensikan dengan 1 x TE sebanyak 25 μ l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit agar melarut sempurna, kemudian disimpan pada suhu -20°C.

3.3.4.7. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR

DNA diamplifikasi menggunakan PCR 30 siklus. Primer yang digunakan :

Forward : AGAGTTTGATCMTGGCTAG

Reverse : AAGGAGGTGWTCCAGCC

Total volume campuran untuk reaksi PCR 25 μ l untuk daerah gen 16S rRNA terdiri dari:

- RTG PCR Beat
- DNA template sebanyak 2 μ l.
- Primer Forward dan Reverse sebanyak 2 μ l.
- ddH₂O sebanyak 21 μ l.

Komposisi di atas untuk 1x siklus reaksi PCR sedangkan jumlah total reaksi PCR adalah 30 siklus (Mustopa, 2009).

3.3.4.8. Gel Elektroforesis.

5 μ l produk PCR ditambah dengan 2 μ l loading dye dielektroforesis pada 100 V selama 40 menit pada 1 % agar premium dalam 0.5x TBE. Sebagai marker digunakan 1 kb DNA ladder (Takara). Gel kemudian diletakkan di dalam wadah ditambah dengan TBE sampai terendam ditambah dengan ethidium bromide sambil digoyang selama 30 detik. Gel kemudian dilihat di bawah lampu UV (Mustopa, 2009).

3.3.4.9. Sekuensing Nukleotida

Sampel yang telah dipurifikasi dikirim ke Jakarta untuk penentuan sekuen nukleotidanya. Sekuen data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan dnastar software. Sekuen dibandingkan dengan database searches yang terdapat pada NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) menggunakan program blastn. Sekuen alignments dilakukan dengan menggunakan metode the clustalW 1.83.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki kekayaan sumber daya alam yang sangat melimpah, termasuk kekayaan alam berupa keanekaragaman mikroba diantaranya BAL. Dalam penelitian ini, sampel yang dianggap sebagai sumber potensial BAL berasal dari buah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) yang diperoleh dari kabupaten Solok propinsi Sumatera Barat.

Buah Markisa kuning (*Passiflora edulis var. flavicarpa*) yang diperoleh dari kabupaten Solok memiliki pH atau tingkat keasaman pada saat sebelum difermentasi yaitu 5,0. Sedangkan setelah difermentasi pH nya turun menjadi 4,2 sesuai dengan hasil analisa Singi (2006), pH sari buah markisa 4,45. Hal ini menunjukkan terbentuknya asam laktat, aroma dan flavour yang dihasilkan dari proses fermentasi Markisa karena kandungan yang terdapat di dalam buah Markisa. Menurut Surono (2004) selain asam laktat yang dihasilkan dari fermentasi mikroba, akan dihasilkan juga senyawa CO₂, asam asetat, etanol, manitol, dan senyawa flavour dari heksosa.

Isolasi bakteri bertujuan untuk memisah dan membiakan bakteri yang terdapat di dalam campuran dengan menggunakan media kultur sehingga diperoleh isolat atau biakan murni (Darwis dan Sukara, 1990). Pada isolasi BAL ini digunakan media isolasi spesifik yaitu media selektif. Media selektif yang digunakan adalah *de Mann, Rogosa, Sharpe Broth*. Media selektif ini digunakan

untuk menumbuhkan dan memelihara bakteri tertentu, dengan sifat kekhususannya tersebut, maka akan menyeleksi BAL secara langsung. Media selektif yang digunakan dalam proses isolasi untuk menumbuhkan BAL ini adalah media MRS Agar.

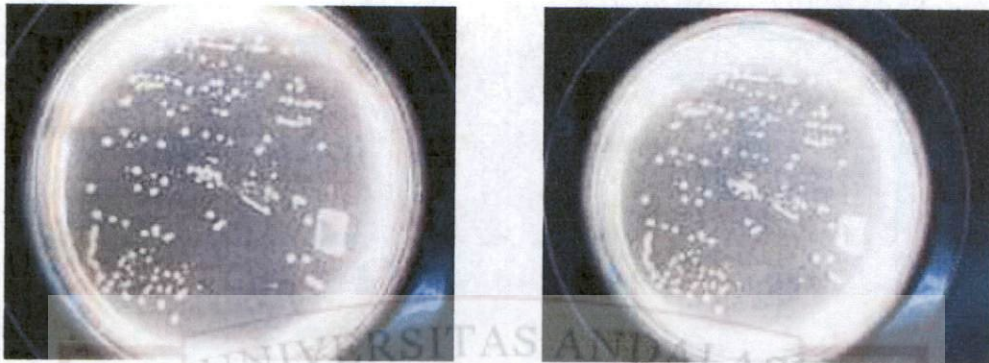
Bakteri dalam sampel diisolasi dengan menggunakan metoda pengenceran bertingkat dan streak pada MRS agar. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengenceran dilakukan sampai 10^{-7} dalam Nutrient Broth. Adapun tujuan dari pengenceran bertingkat ini yaitu untuk memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan tersebut. Selanjutnya, diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, akan muncul koloni-koloni bakteri pada plate tersebut. Koloni tunggal dipindahkan ke dalam *Nutrient Agar Plate* untuk mendapatkan kultur murni bakteri. Hasil yang diperoleh 6 isolat bakteri, yang diberi kode M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, dan M₆.

Dari hasil perhitungan jumlah koloni pada pengenceran 10^{-7} diperoleh M₁ sebanyak $8 \cdot 10^7$ cfu/mL, M₂ sebanyak $150 \cdot 10^7$ cfu/mL, M₃ sebanyak $18 \cdot 10^7$ cfu/mL, M₄ sebanyak $163 \cdot 10^7$ cfu/mL, M₅ sebanyak $88 \cdot 10^7$ cfu/mL, dan M₆ sebanyak $57 \cdot 10^7$ cfu/mL. Karena pada pengenceran tersebut koloni-koloni bakteri sudah terpisah dengan baik, Jumlah total koloni ini memenuhi kriteria sebagai pangan probiotik. Menurut FAO/WHO dalam Dewita (2010) sebagai pangan probiotik yaitu berada pada jumlah $10^6 - 10^8$ cfu/mL.

4.2. Identifikasi BAL

Isolat bakteri yang berhasil diisolasi menggunakan media selektif MRS Broth berdasarkan sifat-sifat umumnya adalah BAL (Bakteri Asam Laktat). BAL merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat pada media pertumbuhannya. Beberapa pendahuluan diketahui sifat-sifat umum dari BAL. Sifat-sifat umum tersebut antara lain, bentuknya basil (batang) dan kokus (bulat), sifat Gram positif, katalase negatif, endospora negatif, motilitas negatif, dan mampu menghasilkan asam laktat. Identifikasi dilakukan terhadap 6 isolat yang telah berhasil diisolasi dapat dilihat pada lampiran 3.

Identifikasi BAL secara makroskopis yang telah diamati diperoleh bentuk koloni yang dihasilkan bulat, ukurannya bervariasi, berwarna putih dan putih kekuning-kuningan, sedangkan Morfologi bakteri yang diperoleh dapat dilihat pada lampiran 2. Bentuknya bermacam-macam ada yang sirkular, tidak teratur, dan rhizoid, ukurannya ada yang besar, sedang, dan kecil, elevasi bakteri ada yang cembung, datar, dan raised, sedangkan bentuk pinggir atau marginnya berbentuk bulat penuh (*entire*), bergerigi tajam, dan lobate. Koloni BAL pada media MRS Agar yang ditemukan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Komang dkk (2005) dan Dewita (2010) yang menyatakan bahwa karakterisasi morfologi isolat BAL berdasarkan warna menunjukkan bahwa koloni berwarna putih susu dengan bentuk bundar.



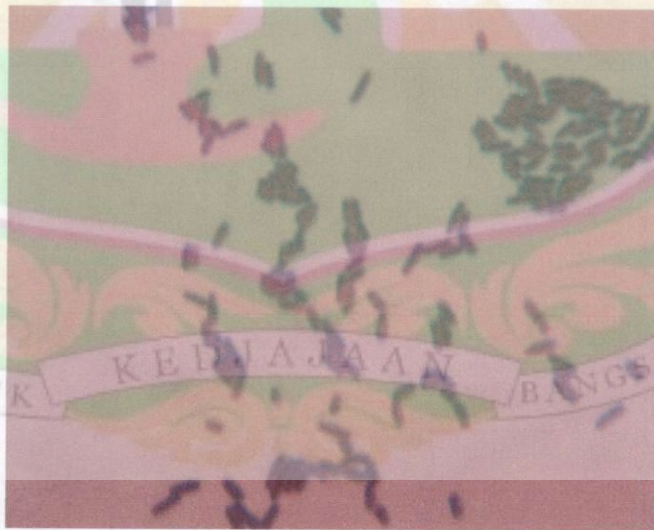
Gambar 11. Penampakan BAL pada Medium MRS agar

Untuk mengetahui jenis bakteri yang dihasilkan, maka dilakukan identifikasi mikroskopik yaitu dilakukan uji Gram. Uji Gram ini dilakukan untuk mengelompokkan bakteri berdasarkan reaksi kimia, dimana uji gram ini akan mengelompokkan bakteri menjadi dua kelompok yaitu Gram positif dan Gram negatif. uji gram ini dilakukan dengan larutan pewarna Gram (*Gram staining*). Proses pewarnaan Gram yang telah dilakukan akan menghasilkan bentuk morfologi dari bakteri tersebut.

Menurut Prescott et al, ketika sel bakteri yang terdapat pada kaca objek ditambahkan dengan pewarna kristal violet yang berwarna ungu, maka sel bakteri akan menyerap pewarna tersebut. Interaksi antara sel bakteri dengan kristal violet akan semakin kuat dengan ditambahkan lugol. Ketika dicuci dengan alkohol, bakteri Gram positif akan tetap mengikat kompleks kristal violet-lugol sehingga menjadi berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif akan kehilangan kompleks kristal violet-lugol karena lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tipis sehingga menjadi tidak berwarna. Ketika ditambahkan dengan safranin yang berwarna merah, maka bakteri Gram negatif akan menyerapnya

sedangkan bakteri Gram positif tidak akan menyerap pewarna lagi. Kultur bakteri yang digunakan dalam pewarnaan Gram ini adalah kultur yang masih muda dan segar.

Dari hasil uji Gram atau pewarnaan Gram sebagian besar diperoleh jenis bakteri *streptobacilli* (bacillus) gram positif, yaitu isolat M₂, M₃, M₄, M₅, dan M₆. satu isolat yang berbentuk *streptococcus* (coccus), yaitu M₁. Pewarnaan Gram pada bakteri didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis serta tidak memiliki membran luar (*outer membrane*). Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada diantara dua lapis membran sel.



Gambar 12. Foto Pewarnaan Gram

Dari tabel 7 dibawah ini, dapat dilihat hasil uji Gram dan pengamatan morfologi di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 x dari isolat BAL. Foto pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel 7. Hasil pengamatan Bentuk Morfologi dari Isolat

NO.	Kode Isolat	Gram	Bentuk Morfologi
1.	M ₁	Positif	Kokus
2.	M ₂	Positif	Basil
3.	M ₃	Positif	Basil
4.	M ₄	Positif	Basil
5.	M ₅	Positif	Basil
6.	M ₆	Positif	Basil

4.3. Aktivitas Enzim Protease

Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan dua cara, yaitu uji secara kualitatif dan kuantitatif. Uji secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan metode screening, dimana masing-masing isolat bakteri ditumbuhkan di dalam media selektif agar susu skim. Susu merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrien, susu skim yang ditambahkan ke dalam medium pertumbuhan berfungsi sebagai substrat enzim. Susu skim mengandung protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium (kalsium kalseinat) yang disebut dengan kasein.

Kasein merupakan molekul yang sangat besar, tidak larut dalam air, dan dapat membentuk koloid. Suspensi ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada saat disuspensikan ke dalam kultur media padat. Kasein akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut karena adanya aktivitas enzim proteolitik ekstraseluler, yaitu enzim protease. Enzim

protease mengkatalisis degradasi kasein dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul menjadi asam-asam amino seperti tirosin.

Hilangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri, dari hasil pengamatan uji screening yang dilakukan terhadap keenam isolat, isolat bakteri mampu merombak kasein yang terdapat di dalam media susu skim. Menurut Pakpahan (2009) aktivitas hidrolisis enzim secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik dalam merombak protein dengan membandingkan besarnya zona bening disekitar koloni dengan besarnya diameter koloni. Hasil pengamatan yang dilakukan setelah 72 jam, dapat dilihat pada tabel 8 di bawah ini.

Tabel 8. Hasil pengamatan zona bening screening enzim

Isolat	Diameter koloni	Zona bening 72 Jam	Aktivitas enzim
M ₁	2 mm	11,5 mm	5,75
M ₂	2 mm	12 mm	6
M ₃	3 mm	11 mm	3,67
M ₄	2 mm	13 mm	6,5
M ₅	3 mm	11 mm	3,67
M ₆	3 mm	10 mm	3,33

Dari tabel 8 di atas, diperoleh tiga isolat yang memiliki zona bening tertinggi, yaitu M₁, M₂, dan M₄ dengan aktivitas enzim sebesar 5,75, 6, dan 6,5 setelah 72 jam. Dari hasil pengamatan isolat M₄ menunjukkan aktivitas enzim

yang tertinggi yaitu sebesar 6,5. M_1 dan M_2 berturut-turut menunjukkan aktivitas sebesar 5,75 dan 6. Hal ini menunjukkan bahwa isolat M_4 memiliki kemampuan yang sangat tinggi dalam merombak protein menjadi senyawa peptida dan asam-asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium.

Menurut Susanti (2003) tingginya kemampuan dari aktivitas enzim proteolitik yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang berperan dalam medium padat tidak dapat diketahui dan diukur secara kualitatif, karena daerah zona bening yang dihasilkan akan bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi. Selain itu, menurut Saron (2006) hasil screening untuk mendeteksi isolat sangat tergantung pada metode screening, media, dan organisme yang digunakan sebagai organisme uji aktivitas enzim. Pemilihan organisme uji yang digunakan dalam proses screening sangat penting, karena setiap organisme uji mempunyai sensitivitas dan spesifikasi tertentu.

Hasil hidrolisis yang telah dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan metode screening, selanjutnya dilakukan uji secara kuantitatif dengan menggunakan metode spektrofotometer. Dari hasil pengukuran kadar protein dengan menggunakan metode Lowry, kurva standar BSA dibuat dengan variasi dari konsentrasi BSA. Absorbansi yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diplotkan sebagai ordinat, sedangkan konsentrasi sebagai axis. Dari hasil pengukuran absorbansi diperoleh persamaan regresi $Y = 0,02983 + 0,001312X$, dapat dilihat pada lampiran 6.

Setelah dilakukan substitusi diperoleh kadar protein sampel untuk M₁, M₂, dan M₄ masing-masing 0,6503 mg/mL, 0,5885 mg/mL, dan 0,6594 mg/mL pada spektrofotometer dengan panjang gelombang yang digunakan sebesar 578 nm. Aktivitas enzim protease yang diperoleh untuk masing-masing sampel M₁, M₂, dan M₄, yaitu 0,7257 Unit/mL, 0,6553 Unit/mL, dan 0,8626 Unit/mL. Sedangkan aktivitas spesifik yang dihasilkan dari enzim protease untuk masing-masing sampel M₁, M₂, dan M₄ sebesar 1,1159 Unit/mg, 1,1134 Unit/mg, 1,3081 Unit/mg (lampiran 7). Isolat M₄ memiliki kemampuan aktivitas protease tertinggi saat dilakukan uji aktivitas secara kualitatif dan kuantitatif, Sedangkan isolat yang terendah saat dilakukan uji secara kualitatif adalah M₁, akan tetapi untuk uji kualitatif dengan spektrofotometer M₁ memiliki aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan M₂. Menurut Pakpahan (2009) adanya perbedaan nilai aktivitas protease secara kualitatif dan kuantitatif disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain perbedaan jenis mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan isolat pada medium padat dan cair, dan jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium.

4.4. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas Antimikroba yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram merupakan metode yang banyak digunakan, yang dikenal dengan metode Kirby-Bauer (Pelczar dan Chan, 1988). Sejumlah bakteri uji diinokulasikan pada media agar dan cakram yang mengandung larutan uji diletakkan pada permukaan media agar yang telah memadat. Setelah diinkubasi menunjukkan hasil yang positif pada semua isolat bakteri asam laktat yang diuji

yaitu adanya zona hambat disekitar cakram sebagai daerah bening yang tidak ditumbuhi bakteri.

Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain *streptococcus*, *pseudomonas*, *eschericia coli*. Pemilihan mikroba uji ini dimaksudkan untuk uji pada sistem pencernaan sebagai probiotik. Dan *stapilococcus* sebagai bakteri uji tambahan dalam penelitian ini. Dari hasil uji aktivitas antimikroba yang telah dilakukan terhadap keenam isolat. Daerah hambat yang terbentuk terlihat sebagai daerah terang atau bening di sekeliling sumur yang kemudian diukur besarnya dengan menggunakan mistar. Hasil Pengamatan zona bening dapat dilihat pada lampiran 5.



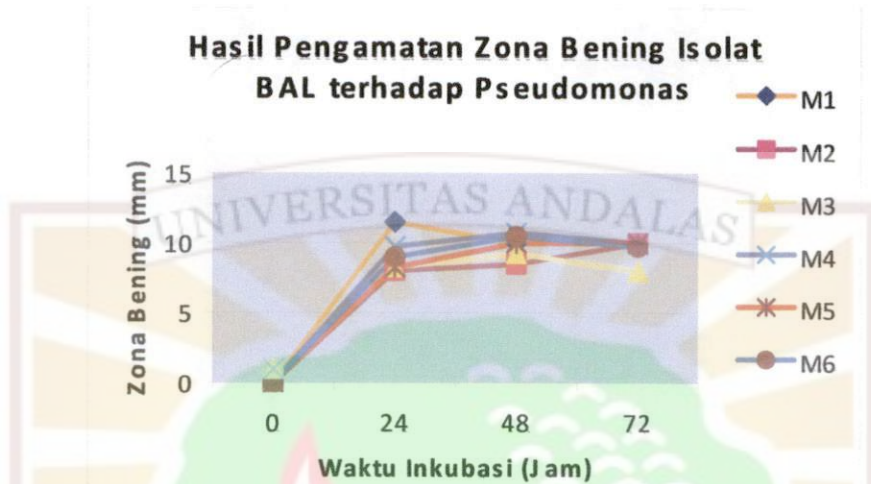
Gambar 13. Grafik Hasil Pengamatan Zona Bening Isolat BAL terhadap Bakteri *E. coli*

Dari gambar 13 di atas, dapat dilihat bahwa kemampuan dari isolat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* berbeda-beda. Isolat M₄ memiliki zona hambat terbesar dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* setiap pengamatan 24

jam yaitu 9,25 mm, 9 mm, 9 mm. Setelah 72 jam zona hambat isolat konstan, sedangkan isolat M₃ memiliki zona hambat terendah yaitu 7,5 mm, 7,5 mm, dan 8 mm. Hasil zona hambat yang diperoleh semuanya berada pada kategori sedang karena berada pada respon zona hambat pertumbuhan antara 5 sampai 10 mm. Hal ini menunjukkan semua isolat masih efektif menghambat pertumbuhan *E. coli* selama 72 jam. Menurut Suroño (2004) zona bening yang terbentuk karena adanya bakteriosin yang menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen, sehingga terbentuk zona bening di sekitar koloni. Adapun mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin yang terjadi, yaitu molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel, proses kontak ini mampu mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat, dan ketidakstabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap *proton motive force* (PMF). Sehingga kemampuan dari potensi membran menjadi hilang dan pertumbuhan dari bakteri patogen menjadi terhambat.

Menurut Sujaya (2008) Adanya penghambatan terhadap bakteri patogen oleh isolat bakteri asam laktat (BAL) menunjukkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) memenuhi salah satu persyaratan dalam pengembangan probiotik. Walaupun masih diperlukan serangkaian penelitian tahap *in vivo*. Aktivitas penghambatan ini dijadikan dasar dalam pemilihan isolat yang dipergunakan untuk penelitian selanjutnya dalam mengembangkan potensi BAL isolat sebagai probiotik. Oleh sebab itu, jika di aplikasikan sebagai probiotik atau obat antibiotik

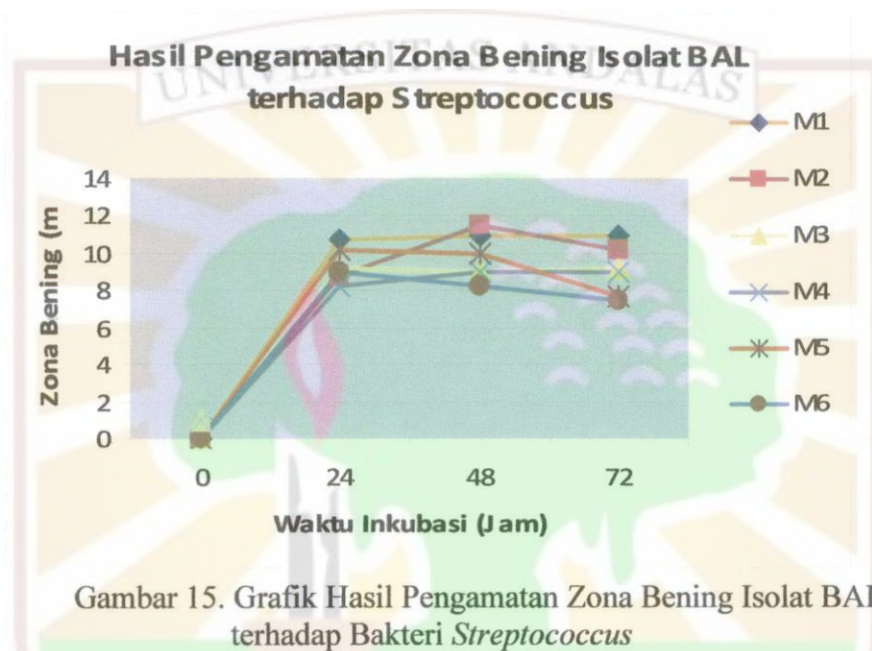
alami maka dapat dilakukan 1x48 jam agar efektif dalam menghambat pertumbuhan dari *Escherichia coli*.



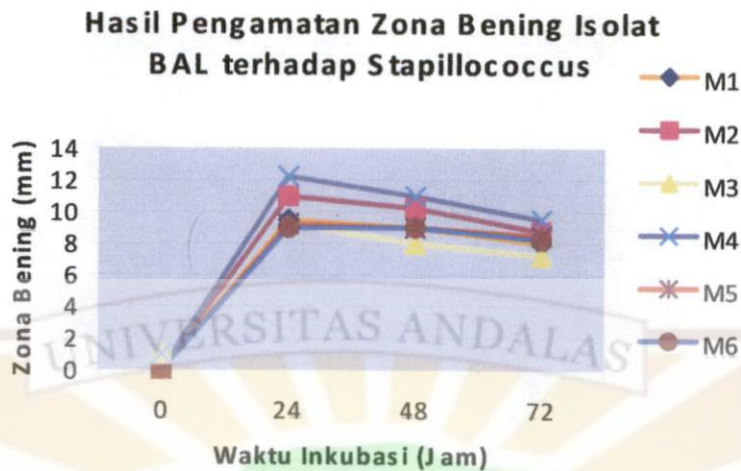
Gambar 14. Grafik Hasil Pengamatan Zona Bening Isolat BAL terhadap Bakteri *Pseudomonas*

Dari gambar 14 di atas, dapat dilihat bahwa kemampuan supernatan isolat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* berbeda-beda. Hampir semua isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *pseudomonas* dengan baik. Dimana isolat M₁ memiliki zona hambat tertinggi pada setiap pengamatan 24 jam yaitu 11,5 mm, 10 mm, dan 10 mm. Sedangkan isolat M₃ memiliki zona hambat terendah jika dibandingkan dengan kelima isolat lainnya, yaitu 8,25 mm, 9,25 mm, dan 8 mm. Menurut Sarkono (2006), ukuran zona bening tergantung pada kecepatan difusi antimikroba pada media agar dan kecepatan pertumbuhan bakteri uji. Isolat M₁, M₂, M₄, dan M₅ pada bakteri uji *pseudomonas* memiliki zona hambat pertumbuhan yang kuat dalam menghambat pertumbuhan dari *pseudomonas* karena memiliki zona hambat ≥ 10 mm (Mardiana, 2007). Sedangkan M₃ dan M₆ memiliki zona hambat pertumbuhan

yang sedang. setelah 48 jam bakteri uji *pseudomonas* kembali aktif, sehingga semua zona bening dari isolat menjadi menurun. jika di aplikasikan sebagai probiotik atau obat antibiotik alami maka dapat dilakukan 1x48 jam agar efektif dalam menghambat pertumbuhan dari *pseudomonas*.



Dari gambar 15 diatas, dapat dilihat bahwa semua isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus*. Isolat M₁ memiliki zona hambat tertinggi pada pengamatan setiap 24 jam, yaitu 10,75 mm, 11 mm, dan 11 mm. Sedangkan M₆ memiliki zona hambat terendah, yaitu 9 mm, 8,25 mm, dan 7,5 mm. M₁, M₂, dan M₅ memiliki zona bening yang kuat sedangkan M₃, M₄, dan M₆ memiliki zona hambat sedang. Setelah 48 jam pengamatan zona bening dilakukan ternyata hampir semua isolat mengalami penurunan zona bening, yaitu M₁, M₅ dan M₆ (lampiran 5) sehingga dapat disimpulkan bahwa jika diaplikasikan sebagai probiotik atau obat antibiotik alami maka dapat dilakukan 1x48 jam agar efektif dalam menghambat pertumbuhan dari *streptococcus*.



Gambar 16. Grafik Hasil Pengamatan Zona Bening Isolat BAL terhadap Bakteri *Stapillococcus*

Dari gambar 16 di atas, dapat dilihat bahwa kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Stapillococcus* juga berbeda-beda. Bakteri uji *Stapillococcus* merupakan bakteri uji tambahan yang digunakan dalam uji antimikroba dari isolat. Tujuannya untuk melihat kemampuan dari isolat terhadap bakteri uji lain dalam menghambat pertumbuhan atau aktivitas dari bakteri patogen tersebut. Dari hasil pengamatan setiap 24 jam. Semua isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Stapillococcus*, dimana isolat M₄ memiliki zona hambat tertinggi yang sangat kuat, yaitu 12,25 mm, 10 mm, dan 9,5 mm. Sedangkan isolat M₃ memiliki zona hambat terendah, yaitu 9,25 mm, 8 mm, 7,25 mm. Isolat M₂ dan M₄ memiliki zona hambat yang sangat kuat selama 48 jam, walaupun zona hambatnya mengalami penurunan. sedangkan isolat yang lainnya memiliki zona hambat sedang dalam menghambat aktivitas dari bakteri *stapiloccus*. Sehingga jika di aplikasikan sebagai obat antibiotik alami maka dapat

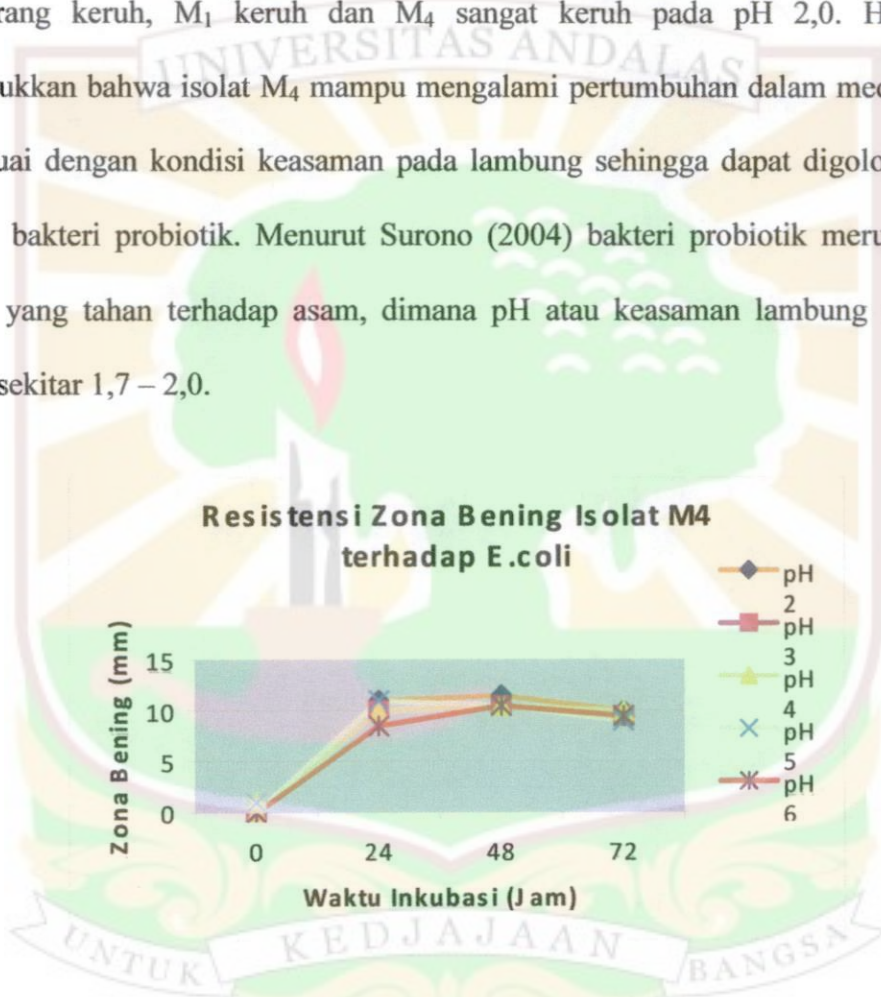
dilakukan 1x24 jam agar efektif dalam menghambat pertumbuhan dari *stapillococcus*.

Dari penjelasan gambar diatas, maka dapat disimpulkan bahwa isolat M₁, M₂ dan M₄ yang diisolasi dari fermentasi Markisa kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), paling efektif dalam menghambat keempat bakteri patogen yang digunakan dalam uji aktivitas antimikroba. Dengan demikian, semua isolat terutama isolat yang terpilih dapat digunakan sebagai biosuplemen probiotik yang dapat menurunkan atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Sehingga dapat mengembalikan keseimbangan mikroflora (rasio antara bakteri patogen dan non patogen) dalam saluran pencernaan terutama pada usus. Nutrisi, vitamin, dan elemen penting lainnya bisa diserap secara sempurna dalam tubuh (Dewita, 2009).

4.5. Resistensi Terhadap Asam

Dari hasil penelitian sebelumnya, keenam isolat yang telah dilakukan uji aktivitas antimikroba dipilih tiga isolat unggul yang akan dilakukan uji resistensi terhadap asam, yaitu isolat M₁, M₂, dan M₄. Masing-masing isolat dari isolat bakteri asam laktat diuji kemampuan pertumbuhannya dalam media pH 2,0 sesuai dengan kondisi keasaman pada lambung dan pada pH 6,0 yang sesuai dengan kondisi pH usus halus (Wijayanto, 2004). Hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan enzim yang lebih banyak sehingga lebih efektif dalam menghambat bakteri yang bersifat patogen, yang dapat dilihat dari spektrum luas zona bening yang dihasilkan.

Dari hasil pengamatan zona bening yang dilakukan setiap 24 jam, dapat dilihat pada lampiran 9 bahwa isolat yang memiliki kemampuan resistensi tertinggi adalah isolat M₁, M₂ dan M₄. Akan tetapi, dilihat dari kekeruhannya semua isolat terlihat keruh pada semua tingkat keasaman dapat dilihat pada lampiran 8. isolat M₂ kurang keruh, M₁ keruh dan M₄ sangat keruh pada pH 2,0. Hal ini menunjukkan bahwa isolat M₄ mampu mengalami pertumbuhan dalam media pH 2,0 sesuai dengan kondisi keasaman pada lambung sehingga dapat digolongkan sebagai bakteri probiotik. Menurut Surono (2004) bakteri probiotik merupakan bakteri yang tahan terhadap asam, dimana pH atau keasaman lambung sangat rendah sekitar 1,7 – 2,0.



Gambar 17. Resistensi Isolat M₄ terhadap Bakteri *E.coli*

Dari gambar 17 di atas, terlihat bahwa pada pH 2,0 yang memiliki zona bening tertinggi terhadap bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu melawan atau menghambat bakteri patogen pada pH lambung 2,0 sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut bersifat probiotik. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Fetlinski dan Stepaniak (1994) menyebutkan bahwa

dapat tidaknya suatu bakteri sebagai probiotik tergantung resistensi atau ketahanan probiotik terhadap pH rendah, garam empedu, dan kemampuan untuk hidup dalam sistem pencernaan.

Syarat utama suatu isolat berpotensi sebagai probiotik adalah memiliki toleransi yang tinggi terhadap asam lambung dan garam empedu dalam saluran pencernaan. Kondisi kritikal yang harus dihadapi bakteri probiotik dalam saluran pencernaan manusia dimulai dari lambung, yaitu bakteri harus mampu bertahan terhadap pH yang sangat rendah (pH 2,0) selama minimal 90 menit. Bakteri probiotik selanjutnya memasuki saluran usus (pH 6,0) yang merupakan tempat disekresikan garam empedu (Arief *et al.*, 2006). Dari hasil yang telah diperoleh, maka yang memiliki aktivitas enzim protease dan uji resistensi terhadap asam yang paling baik isolat M₄. Dimana isolat ini memiliki aktivitas enzim tertinggi, baik dengan menggunakan metode screening maupun spektrofotometer, serta resistensi terhadap pH asam yang tinggi pada pH 2,0. maka, isolat M₄ dipilih sebagai isolat unggul untuk digunakan pada isolasi DNA.

4.6. Isolasi DNA

isolasi DNA yang akan dilakukan yaitu pada Isolat M₄ sebagai isolat pilihan. Pada prinsipnya isolasi DNA adalah upaya untuk membebaskan materi-materi genetik dari dinding sel dan ikatan protein-protein histon terletak di dalam inti sel dengan mengupayakan tingkat kerusakan baik mekanis maupun fisis seminimal mungkin terhadap materi genetika tersebut. Adapun prosedur preparasi DNA total dari kultur sel bakteri dapat dibagi menjadi empat tahap, yaitu kultur

bakteri isolat M₄ dalam media MRS Broth dipanen. Untuk menyiapkan suatu ekstrak sel, bakteri harus diperoleh dalam jumlah yang sekecil mungkin. Oleh karena itu, pemanenan dilakukan dengan memutar kultur dalam sentrifus. Kecepatan sentrifugasi akan mengendapkan bakteri pada dasar tabung sentrifus sehingga medium kultur di atasnya dapat dibuang.

Tahap kedua, sel bakteri dilisis untuk membebaskan isinya dengan menggunakan EDTA (*Ethhylene diaminetetraacetic Acid*) dan SDS (*Sodium duodecyl sulfonat*). EDTA (*Ethhylene diaminetetraacetic Acid*) menghilangkan ion Magnesium yang penting untuk mempertahankan keseluruhan struktur selubung sel, selain berfungsi untuk menghambat enzim-enzim seluler yang dapat merusak DNA. Sedangkan SDS (*Sodium duodecyl sulfonat*) berupa deterjen yang membantu proses lisis dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sel bakteri.

Setelah sel mengalami lisis, selanjutnya langkah terakhir pada preparasi ekstrak sel adalah menghilangkan debris sel yang tidak larut. Komponen-komponen tersebut diendapkan dengan sentrifugasi sehingga meninggalkan ekstrak sel berupa supernatan yang jernih. Selain mengandung DNA, ekstrak sel bakteri juga mengandung protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar. Oleh sebab itu, ditambahkan proteinase K karena enzim-enzim ini akan memecah polipeptida menjadi unit yang lebih kecil. Selain itu, untuk mendegradasi protein-protein yang mengikat benang-benang DNA pada kromosom. Selanjutnya, diinkubasi dalam water bath pada suhu 37⁰C selama satu jam, hal ini bertujuan untuk memaksimalkan kerja enzim proteinase K dalam memecah protein.

Tahap ketiga, selanjutnya ditambahkan campuran PC (phenol:chloroform) untuk menghilangkan protein dari ekstrak sel selain DNA sehingga pelarut organik PC (phenol:chloroform) ini akan menyebabkan presipitasi protein, tetapi asam nukleat (DNA dan RNA) tetap berada dalam larutan. sehingga, setelah disentrifugasi maka molekul protein mengalami presipitasi akan tertinggal sebagai massa putih (debris) pada perbatasan antara dua lapisan, yaitu lapisan organik dan lapisan akuosa. Pada lapisan bawah terdapat larutan organik sedangkan di lapisan atas terdapat larutan akuosa asam nukleat (DNA dan RNA). Menurut Muhammad (1991) beberapa molekul RNA akan hilang dengan penambahan PC (phenol:chloroform), tetapi kebanyakan molekul ini akan tetap bersama DNA dalam lapisan akuosa. Satu-satunya cara yang efektif untuk menghilangkan RNA adalah dengan menggunakan enzim ribonuklease yang akan memecah molekul ini dengan cepat menjadi subunit ribonukleotida. Akan tetapi, penambahan PC (phenol:chloroform) tidak dianjurkan terlalu sering karena setiap penyampuran dan sentrifugasi akan mengakibatkan pecahnya molekul DNA dalam jumlah tertentu. Oleh sebab itu, lapisan atas yang mengandung larutan akuosa di ambil dengan pipet secara hati-hati untuk dipindahkan ke eppendrof yang baru.

Tahap terakhir, larutan DNA yang dihasilkan kemudian dipekatkan. Larutan yang telah dipindahkan ke dalam eppendrof baru tersebut ditambahkan dengan garam natrium asetat yang berfungsi untuk netralisasi (*neutralize charge*) pada gula fosfat DNA. Selanjutnya, ditambahkan dengan isopropanol dan disentrifus sehingga menyebabkan DNA terpresipitasi dengan baik dan DNA yang diperoleh akan semakin pekat. Pengendapan DNA akan terlihat berupa benang-

benang halus setelah penambahan isopropanol. Kemudian, sisa campuran isopropanol dibuang dan dicuci eppendrof yang berisi DNA tersebut dengan menggunakan etanol 70%. Selanjutnya, sisa etanol 70% dibuang, sehingga tinggal pellet yang tersisa. Kemudian DNA tersebut dikeringkan pada suhu kamar, pengeringan ini sangat penting agar tidak ada lagi cairan lain yang tersisa pada pellet. Di dalam eppendrof terlihat seperti lapisan lem yang mengering yang dipastikan adalah DNA yang sudah mengering. Kemudian dilarutkan kembali dengan 1 x buffer TE. Hal ini bertujuan agar DNA tersebut dapat digunakan dalam waktu yang cukup lama. Setelah diperolehnya DNA hasil isolasi tersebut, maka dilakukan kontrol terhadap kualitas DNA yang telah diperoleh, yaitu dengan cara merunning DNA pada elektroforesis standar. Kemudian, eppendrof tersebut disimpan pada suhu -20°C .

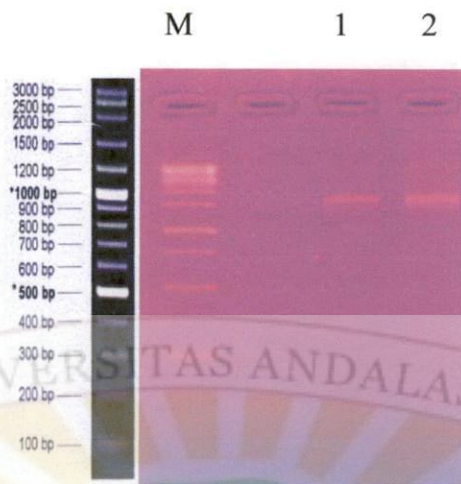
4.7. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

DNA bakteri yang berasal dari isolat M_4 yang telah diperoleh dijadikan template, kemudian DNA dan primer universal diamplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer universal yang digunakan dalam mengamplifikasi DNA adalah 27F dan 1525R. Menurut Liang dan Lungisa dalam Octarya (2009) mereka telah menggunakan kedua primer universal ini untuk mengamplifikasi DNA bakteri jenis bacillus dan menghasilkan produk 1450 bp. Youseuf, dkk (2009) untuk mengamplifikasi strain bacillus. Octarya (2009) juga telah menggunakan primer universal ini untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri air panas S2A dan menghasilkan produk 1500 bp. Selain itu, Dewita

(2009) juga telah berhasil mengamplifikasi gen 16S rRNA isolat 13B dari biskuit blondo dan menghasilkan produk 1500 bp.

Pada prinsipnya proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pertama kali adalah denaturasi pita ganda DNA melalui reaksi pemanasan dengan suhu 94°C selama beberapa saat, kemudian pengikatan primer-primer (*annealing*) ke pita tunggal molekul DNA yang biasanya berlangsung pada suhu tertentu, tergantung pada karakteristik primer yang digunakan. Dalam hal ini suhu annealing yang digunakan adalah sebesar 36°C . Selanjutnya, reaksi pembentukan molekul DNA sintesis (*extention*) dari bahan dNTPs.

Proses pembentukan atau perpanjangan molekul DNA sintesis yang dikatalisis oleh enzim *Taq polymerase* yang memiliki kecepatan pembentukan sekitar 150 nukleotida perdetik. Pembentukan molekul DNA sintesis (*extention*) ini dilakukan pada suhu 72°C . Hasil isolasi DNA yang sudah diamplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR dari isolat M₄ Markisa kuning (*Passiflora edulis var. falvicarpa*) dengan menggunakan primer universal tersebut menghasilkan produk 1500 bp. Selanjutnya, produk PCR dikirim untuk di sekuensing. Pengiriman produk PCR ke Company Macrogen, Inc Jalan World Meridien Venture 10F, 60-24 Gasan Dong, kota Geumcheon-gu, Seoul, Korea 153-023.



Gambar 18. Visualisasi produk amplifikasi dengan PCR DNA isolat BAL terpilih M₄. Lane M= DNA marker 1 kb (Takara), lane 1 dan 2 = Sampel M₄

4.8. Sekuensing Nukleotida

Sekuens yang diperoleh diolah menjadi sekuens konsensus dengan menggunakan *DNA sequence analyzing software*. Untuk analisa penyejajaran sekuens dibandingkan dengan yang telah ada pada *Gen Bank of National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan BLAST dan *Multiple-Alignment Analysis* yang diakses melalui internet.

Diperoleh hasil sekuensing yang dilakukan secara *one road direction* dengan menggunakan primer universal yang sama saat amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR. Hasil sekuensing berupa urutan basa-basa nukleotida yang akan dibandingkan dengan data GeneBank melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Persentase identitas bakteri dari sampel buah Markisa isolat M₄ yang diperoleh adalah 98% dengan *Weissella cibaria strain II-I-59* dapat dilihat pada gambar di bawah ini. Menurut Chai Hugh et.al (2003) kesamaan sekuensing $\geq 97\%$ menunjukkan spesies yang identik dibandingkan dengan isolat

yang mempunyai kesamaan sekuensing lebih kecil dari 97%, berarti taksonominya telah berbeda. Dari perbandingan sekuen gen 16S rRNA yang diperoleh dengan data GenBank

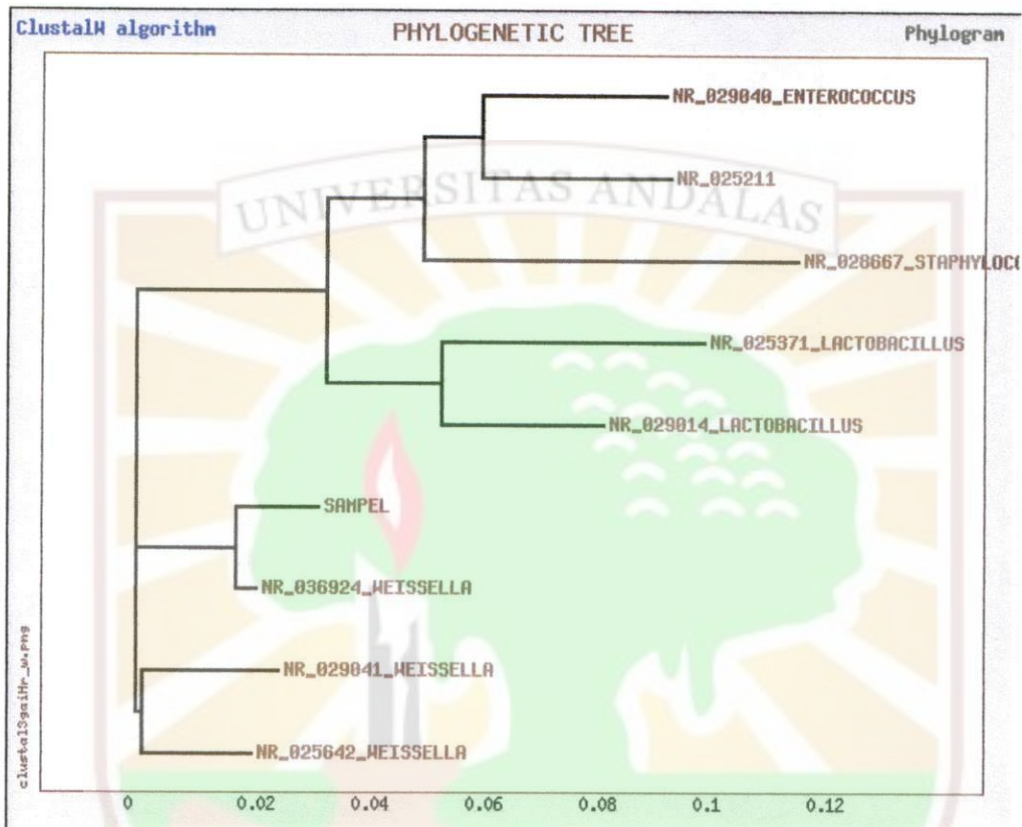
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NR_036324.1	Weissella cibaria strain II-I-59 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ295989.1 Weiss	1463	1463	98%	0.0	99%	
NR_029041.1	Weissella korensis strain S-5623 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY035591.1 Wei	1461	1461	98%	0.0	94%	
NR_025642.1	Weissella soli strain M028 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY028266.1 Weissella st	1452	1452	98%	0.0	94%	
NR_036788.1	Lactobacillus pontis strain LTH 2987 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X76329.1 L.p	1127	1127	98%	0.0	89%	
NR_026310.1	Lactobacillus panis strain DSM 6035 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X94230.1 L.p	1105	1105	98%	0.0	88%	
NR_029014.1	Lactobacillus rossiae strain CS1 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ564009.1 Lact	1098	1098	92%	0.0	89%	
NR_029084.1	Lactobacillus gastricus strain Kx156A7 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AY253658	1081	1081	98%	0.0	87%	
NR_026371.1	Lactobacillus frumenti strain THW 1.666 16S ribosomal RNA, complete sequence >emb AJ2500	1081	1081	98%	0.0	87%	
NR_027206.1	Lactobacillus antri strain Kx146A4 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY253659.1 Lact	1074	1074	98%	0.0	87%	
NR_026302.1	Lactobacillus oris strain DSM 4864 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X94229.1 Leri	1074	1074	98%	0.0	87%	
NR_024994.1	Lactobacillus mucosae strain CCUG 43179 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF126	1066	1066	98%	0.0	87%	
NR_025715.1	Lactobacillus sakei subsp. carnosus strain CCUG 34545 16S ribosomal RNA, partial sequence >	1059	1059	98%	0.0	89%	
NR_028101.1	Lactobacillus ingluviat strain KR3 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF333975.1 Lacto	1055	1055	98%	0.0	87%	
NR_028777.1	Leuconostoc gasicomitatum strain TB1-10 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF231131	1051	1051	90%	0.0	88%	
NR_029034.1	Leuconostoc kimchii strain JH25 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF173986.1 AF1739	1051	1051	90%	0.0	88%	
NR_027082.1	Enterococcus hirae strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb Y17302.1 Enterococo	1042	1042	90%	0.0	88%	
NR_036922.1	Enterococcus durans strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ276354.1 Ente	1040	1040	90%	0.0	88%	
NR_037004.1	Lactobacillus dioliverans strain JKD6 16S ribosomal RNA, partial sequence	1038	1038	98%	0.0	86%	
NR_024445.1	Lactobacillus collinoides strain JCM1123 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB005893.	1037	1037	91%	0.0	88%	
NR_025035.1	Leuconostoc gelidium strain DSM5578 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF175402.1 L	1035	1035	90%	0.0	88%	
NR_029040.1	Enterococcus phoeniculiicola strain JLB-1 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY028437.	1033	1033	90%	0.0	88%	
NR_025579.1	Lactobacillus spicheri strain LTH 5753 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ534844.1	1033	1033	91%	0.0	88%	
NR_028990.1	Lactobacillus vermouthensis strain KU-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	1031	1031	98%	0.0	86%	
NR_025447.1	Lactobacillus parapantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_026439.1	Enterococcus raffinosus strain 1789-79 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb Y18296.1	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_028705.1	Enterococcus pseudoavium strain 47-16 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF061002.1	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_026880.1	Lactobacillus paracasei subsp. paracasei strain R094 16S ribosomal RNA, partial sequence >db	1027	1027	91%	0.0	88%	
NR_025985.1	Lactobacillus saerimneri strain GD4154 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY255802.1	1026	1026	98%	0.0	86%	
NR_029133.1	Lactobacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D79211.1 LBA1	1026	1026	90%	0.0	89%	
NR_028658.1	Lactobacillus satsumensis strain NRIC 0604 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB154	1022	1022	90%	0.0	88%	
NR_036921.1	Enterococcus villorum strain 88-5474 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ271329.1	1022	1022	90%	0.0	88%	
NR_037122.1	Lactobacillus zeae strain RIA 482 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D86516.1 Lactob	1022	1022	90%	0.0	89%	
NR_025189.1	Lactobacillus pantheris strain LMG 12017 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF4135;	1020	1020	90%	0.0	88%	
NR_029039.1	Lactobacillus parakefiri strain GCL 1731 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY026750.1	1020	1020	91%	0.0	87%	
NR_024895.1	Paralactobacillus selangorensis strain LMG 17710 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF	1018	1018	90%	0.0	88%	
NR_026461.1	Lactobacillus dextransus strain JCM 5887 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D87679.1	1016	1016	90%	0.0	87%	
NR_036789.1	Lactobacillus fructivorans strain DSM 20203 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X763	1016	1016	90%	0.0	88%	
NR_029126.1	Pediococcus parvulus strain S-182 16S ribosomal RNA, partial sequence	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_028748.1	Enterococcus avium strain E5844 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF133535.1 AF13	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_024906.1	Enterococcus mundtii strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF061013.	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_025153.1	Fructobacillus ficulneus strain FS-1 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF360736.1 Leu	1013	1013	90%	0.0	89%	
NR_025154.1	Fructobacillus fructosus strain DSM 20349 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF360737	1011	1011	90%	0.0	88%	
NR_024899.1	Lactobacillus manihotivorus strain OND 32 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF00	1011	1011	90%	0.0	87%	

Gambar 19. Hasil Data GeneBank BLAST

Berdasarkan persentase identitas yang lebih besar dan mempunyai nilai harapan (E value) 0,0, maka isolat M_4 setelah dilakukan analisis kekerabatan strain dari isolat M_4 yang telah ditemukan melalui data GeneBank BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) selanjutnya dilakukan ClustalW 1.83 secara online

untuk menentukan filogenetiknya dapat dilihat bahwa Isolat M₄ memiliki kekerabatan yang sangat mirip dengan *Weissella cibaria* strain 11-1-59.



Gambar 20. Filogenetic tree isolat M₄ *Weissella cibaria* strain 11-1-59 dengan beberapa strain *Weissella* dan bakteri lain yang ada di data GeneBank BLAST.

Dari gambar 20, di atas merupakan gambar phylogram, yang menunjukkan perubahan karakter melalui panjang cabang dari isolat M₄. Isolat M₄ diatas mempunyai kesamaan dengan *Weissella cibaria* strain 11-1-59. *Weissella cibaria* merupakan bakteri yang termasuk ke dalam kelas *Bacillus*, ordo *Lactobacillus*, family *Noctuoidea* dan genus *Weissella* (Bjorkroth et al. 2002).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Hasil Pengamatan bentuk morfologi dari masing-masing isolat diperoleh jenis bakteri *streptobacilli* (bacillus) gram positif, yaitu isolat M₂, M₃, M₄, M₅, dan M₆. satu isolat yang berbentuk *streptococcus* (coccus), yaitu M₁.
2. Isolat yang mempunyai kemampuan tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen adalah isolat M₁, M₂, dan M₄.
3. Kadar protein yang diperoleh dari persamaan regresi untuk masing-masing sampel M₁, M₂, dan M₄ adalah 0,65023 mg/mL, 0,58854 mg/mL, dan 0,65943 mg/mL. Aktivitas enzim yang diperoleh 0,72567 Unit/mL, 0,6553 Unit/mL, 0,8626 Unit/mL. Dan untuk aktivitas spesifik yang dihasilkan sebesar 1,11594 Unit/mg, 1,1134 Unit/mg, dan 1,3081 Unit/mg.
4. Isolat M₂ dan M₄ yang diperoleh bersifat probiotik karena resisten terhadap asam yaitu pada pH 2,0.
5. Isolat M₄ yang diisolasi dari buah Markisa Kuning (*passiflora edulis var.flavicarpa*) mempunyai persentase kesamaan tertinggi sebesar 98% dengan *Weisella cibiria strain 11-1-59*

5.2 SARAN

Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan tentang karakterisasi bakteriosin dan pemurnian dengan kolom untuk memurnikan bakteriosin dengan kromatografi kolom, serta menentukan struktur asam-asam amino dari isolat bakteri yang sudah diidentifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

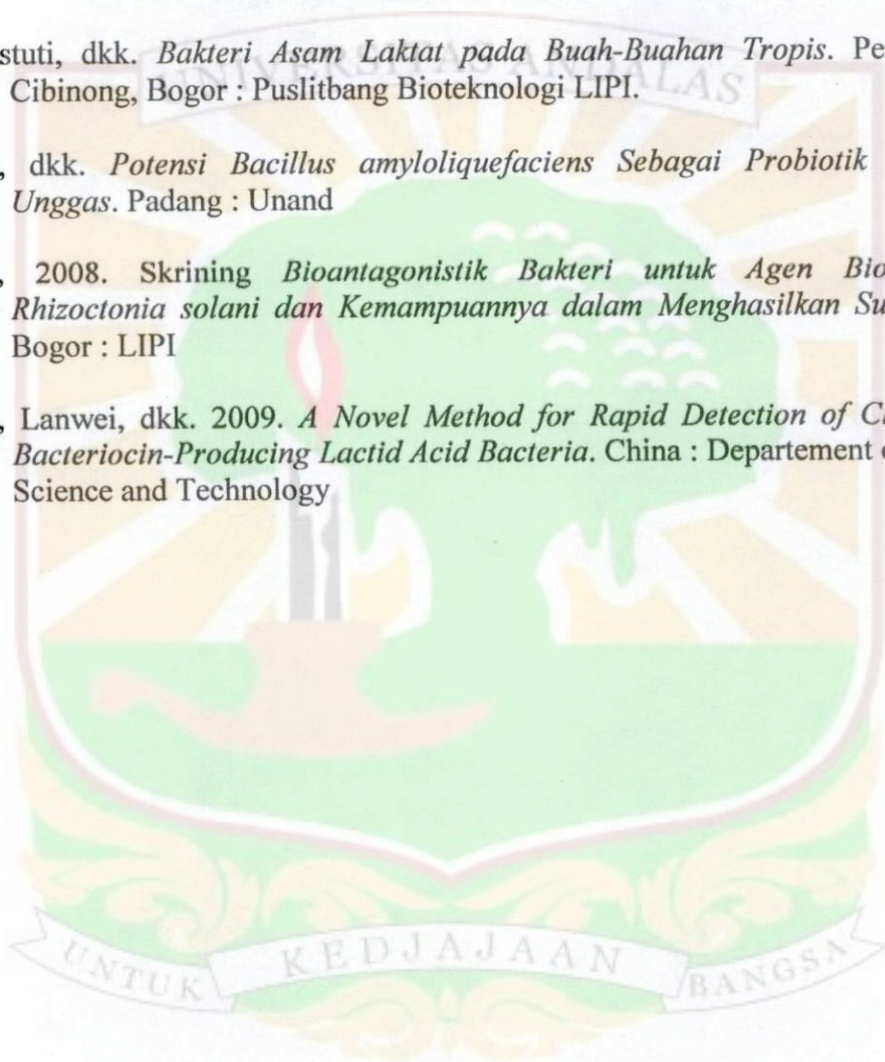
- Abdullah, Chainulfiffah. 2003. *Dekteksi Bakteri Patogen Stereptococcus Pyogenes dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR)*. 6 (1) : 1-4 (2003).
- Anam, Khairul. 2010. *Produksi Enzim Amilase*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Arici, M. 2003. *Some Characterization of Lactobacillus Isolates from Infant Faeces*. Turkey : Food Microbiology
- Baron, C. dan P. C. Zambryski. 1995. *Notes from the Underground: Highlights from Plant-Microbe Interaction*. *Tibtech*. 13 : 356-361.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet, and M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 365 hlm.
- Das, Gitishre. 2010. *Isolation, Purification And Mass Production Of Protease Enzyme From Bacillus subtilis*. India : Bagalore
- Dewita, Sri M. 2010. *Identifikasi Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Biskuit Blondo Yang Berpotensi Menghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen*. Padang : Universitas Andalas
- Feliatra. 1999. *Identifikasi Bakteri Patogen (Vibrio sp) di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau*. II (1) : 28-33 (1999).
- Fuller, R. (ed). (1992). *Probiotik and Scientific Basi*. London : Chapman andhall.
- Goldin, B.R. 1998. *Health benefits of Probiotics*. *British J. Nutr.* 80. Suppl. 2, S231-S233.
- Grajek, Wlodzimer., et al. 2005. *probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods*. *Acta Biochimica Polonica*. 52 (3) : 665-671
- Hardiningsih, Riani, dkk. 2005. *Isolasi Dan Uji Resistensi Beberapa Isolat Lactobacillus Pada pH Rendah*. Bogor: LIPI
- Harnel. *Evaluasi Kinerja Juicer Tipe Mekanis Untuk Buah Markisa Pada Berbagai Tingkat Kematangan*. Sumatera Barat : Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Barat.
- Haryanto, R. 2005. *Antara Antibiotik, Probiotik dan Prebiotik*. Bandung : Asisten mobil lab Basic Science Center ITB.

- Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. *Bacteriocins of Gram-positive bacteria*. Microbi. Rev. 59 (2): 171-200.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Riau : Unri Press.
- Kelly, W.J, dkk. 1996. *Isolation and Characterization of Bacteriocin-Producing Lactid Acid Bacteria from Ready-to-Eat Food Products*. New zealand : Horticulture fFood Research Institute
- Kosim, Mukhammad. 2010. *Pengaruh Suhu Pada Proteinase dari Bacillus subtilis*. Surabaya : ITS
- Kusmiati. 2002. *Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri Leunostoc mesenteroides Pbac 1 Pada Berbagai Media*. Vol 6. No. I juli 2002.
- Lehninger, Albert L. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 3*. Jakarta : Erlangga.
- Lunggani, Arina T. 2007. *Kemampuan Bakteri Asam Laktat Dalam Menghambat Pertumbuhan dan Produksi Aflatoksin B2 Aspergillus flavus*. Semarang : Undip
- Martinezs, B., M. Fernandez, J. E. Suarez. And A. Rodriguez. 1999. *Synthesis of Lactococcin 972, a Bacteriocin Produced by Lactococcus Lactis IPLA 972, depends on the expresstion of a Plasmid-encoded bicistronic operon*. Microbiology 145: 3255-3161.
- Martirani, L., M.Varcamonti.G. Naclerio and M. De Felice. 2002. *Purification and Partial Characterization if Bacillon 490, a novel Bacteriocin Produced by Thermophillic Strain of BacillusLicheniformis*. Microb cell Fact. 1 (1):. 1.
- Meryandini, Anja,dkk. 2009. *Isolasi Bakteri Selulolitik Dan Karakterisasi Enzimnya*. Bogor: IPB
- Montville, T.J. and Y. Chen. 1998. *Mechanistic Action of pediocin and nicin: recent progres and unresolved question*. App. Microbiol Biothechnol 50 (5): 511-519.
- Moon, Sun Young, dkk. 1994. *Purification And Characterization Of An Extracelluler Alkaline Protease From Bacillus subtilis RM615*. Korea :Toejon
- Mustopa, Apon. 2009. *Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler*. Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI.
- Nunuk, P. 2003. *Metabolisme Bakteri*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Medan : Universitas Sumatera Utara.

- Octarya, Zona. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Gen 16S rRNA Bakteri termofilik dari Sumber air panas Bukit kili ketek solok serta karakterisasi enzim selulase dan amilasena*. Padang : Universitas Andalas.
- Pakpahan, Rosiana. 2009. *Isolasi Bakteri Uji Aktivitas Protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara*. Medan : USU
- Pangastuti, Artini, 2006. *Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA Dan Gen Penyandi Protein*. Surakarta : UNS
- Ponce, A.G., dkk. 2007. *Preliminary Characterization of Bacteriocin-Like Substances from Lactid Acid Bacteria Isolated from Organic Leafy Vegetables*. Argentina : Science Direct
- Purwandhani, Siti n, dkk. 2007. *Stabilitas Thermal Agensia Probiotik L. Achidophilus SNP 2 Terenkapsulasi Metode Ekstrusi Dan Emulsi*. Yogyakarta : UGM
- Putranto, Wendry Setiadi. 2006. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang Dihasilkan Lactobacillus achidophilus dalam Fermentasi Susu Sapi Perah*. Seminar Nasional Bioteknologi Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.
- Rahmadi, Anton. *Application Of Lactic Acid Bacteria To Increase Microbiological Safety Against Staphylococcus aureus in Minimally Processed Malang Apple (Malus sylvestris Mill)*. Universitas Mulawarman: Fakultas Pertanian
- Rajaram, G. 2010. *Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus lactis Isolated from Marine Environment*. 2 (2) : 138-144. 2010.
- Rostini, Iis. 2007. *Peranan Bakteri Asam Laktat (Lactobacillus plantarum) terhadap Masa Simpan Filet Nila Merah pada Suhu Rendah*. Jatinangor: Tesis Master Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan Universitas Padjajaran.
- S, Misgiyarta, dkk. *Seleksi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus*. Bogor: LIPI
- Sablon, E., B. Contreras and E. Vandamme, 2000. *Antimicrobial peptides of lactid acid bacteria: Mode of Action, genetics and biosynthesis*. Adv Biochem Eng Biothenol. 68: 21-60.
- Salminen, S. & von Wright, A. 1998. *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker. New York.

- Sarkono, dkk. 2006. *Isolasi, Seleksi, Karakterisasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin Dari Berbagai Buah Masak*. Yogyakarta : UGM
- Sharpe, M.E. (1981). The Genus *Lactobacillus* In The Procaryotes : A Handbook on Habitats, *Isolation and Identification of Bacteria* (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds). Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1674.
- Sunjaya, Nengah. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susus Kuda Sumbawa*. Vol. 9 No.2: 52-59.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik: Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta : PT. Tri Cipta Karya.
- Surono, I.S. & Nurani, D. 2001. *Exploration of indigenous dadih lactic bacteria for probiotic and starter cultures*. Domestic Research Collaboration Grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Research Report. January 2001.
- Syukur, Sumaryati dkk. 2005. *Lactobacillus sp. Isolasi dan Biovicophitomega sebagai Probiotik*. Jakarta : Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Syukur, Sumaryati. 2010. *Fermentation of Cacao Bean, Spesific Cacao Aroma and Potensial Probiotik LAB Isolated from West Sumatra Environment*, Proceeding International Seminar of Cacao Research, Hamburg Germany, PAR B, Dibiayai DITNAGA-DIKTI, Nov 2009 -Feb 2010.
- Syukur, Sumaryati. 2010. *Bacteriocin Produce in Food Microbe Structure and Function*, Review Journal Environmental Microbiology, Submitted.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S dan Wannamaker, L.W., 1976. *Bacteriocins of Gram-positive bacteria*. Bacteriology Reviews, 40, 722-756.
- Triana, Evi. 2006. *Uji Viabilitas Lactobacillus sp. Mar 8 Terenkapsulasi*. Vol 7. No 2 : 114-117.
- Tsakalidou, dkk. 1999. *Cell-Wall_Bound Proteinase of Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis ACA-DC 178: Characterization and Secificity for β -Casein*. Vol. 65, No 5.
- Toit, Maret du. 2008. *Genetic Screening of Lactid Acid Bacteria of Oenological Origin for Bacteriocin-Encoding Genes*. South Africa : Institute For Wine Biotechnology
- Unus, S. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta : Papas Sinar Sinanti.

- Usharani, B. *Production And Characterization Of Protease Enzyme From Bacillus laterosporus*. India: Madras University
- Usmiati, Sri. 2007. *Seleksi dan Optimasi Proses Produksi Bakteriosin dari Lactobacillus sp.* Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. 27-37.
- VH, Elfi Susanti, 2002. *Isolasi Dan Karakterisasi Protease dari Bacillus subtilis 1012M15*. Surakarta : Universitas Sebelas Maret
- Widyastuti, dkk. *Bakteri Asam Laktat pada Buah-Buahan Tropis*. Permi'98. Cibinong, Bogor : Puslitbang Bioteknologi LIPI.
- Wizna, dkk. *Potensi Bacillus amyloliquefaciens Sebagai Probiotik Ternak Unggas*. Padang : Unand
- Yuliar, 2008. *Skrining Bioantagonistik Bakteri untuk Agen Biokontrol Rhizoctonia solani dan Kemampuannya dalam Menghasilkan Surfaktin*. Bogor : LIPI
- Zhang, Lanwei, dkk. 2009. *A Novel Method for Rapid Detection of Class Iia Bacteriocin-Producing Lactid Acid Bacteria*. China : Departement of Food Science and Technology



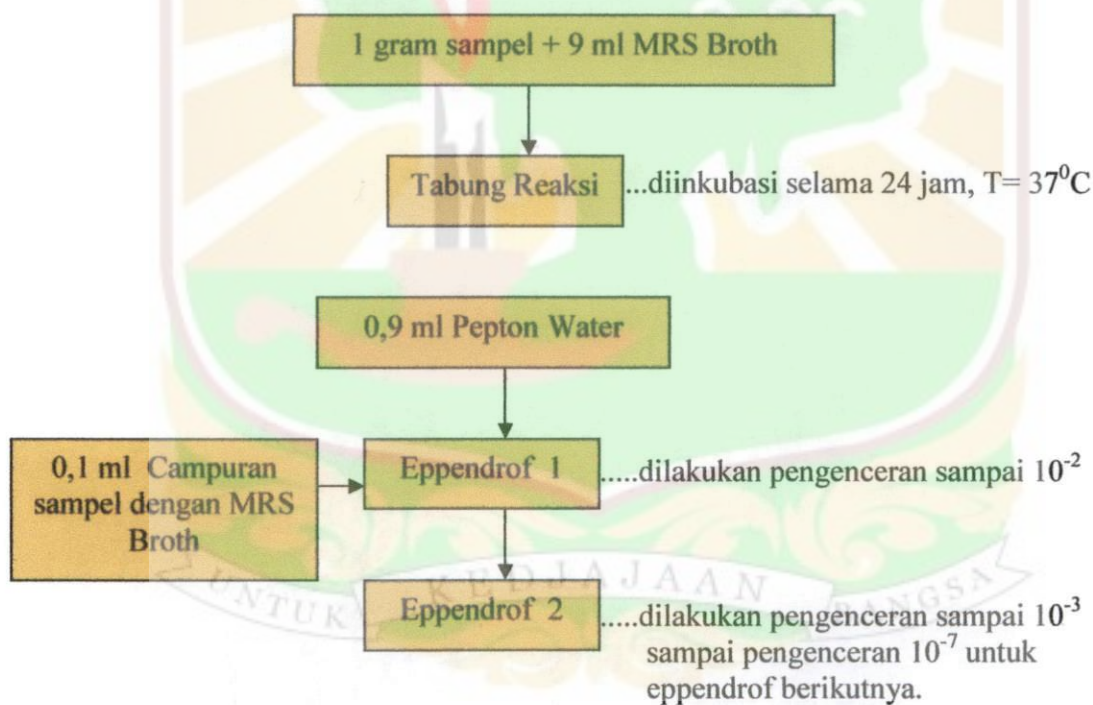
Lampiran 1. Skema Kerja

Proses Fermentasi dan Isolasi BAL dari Markisa Kuning

Proses Fermentasi Markisa Kuning



Isolasi BAL Dari Fermentasi Markisa Kuning

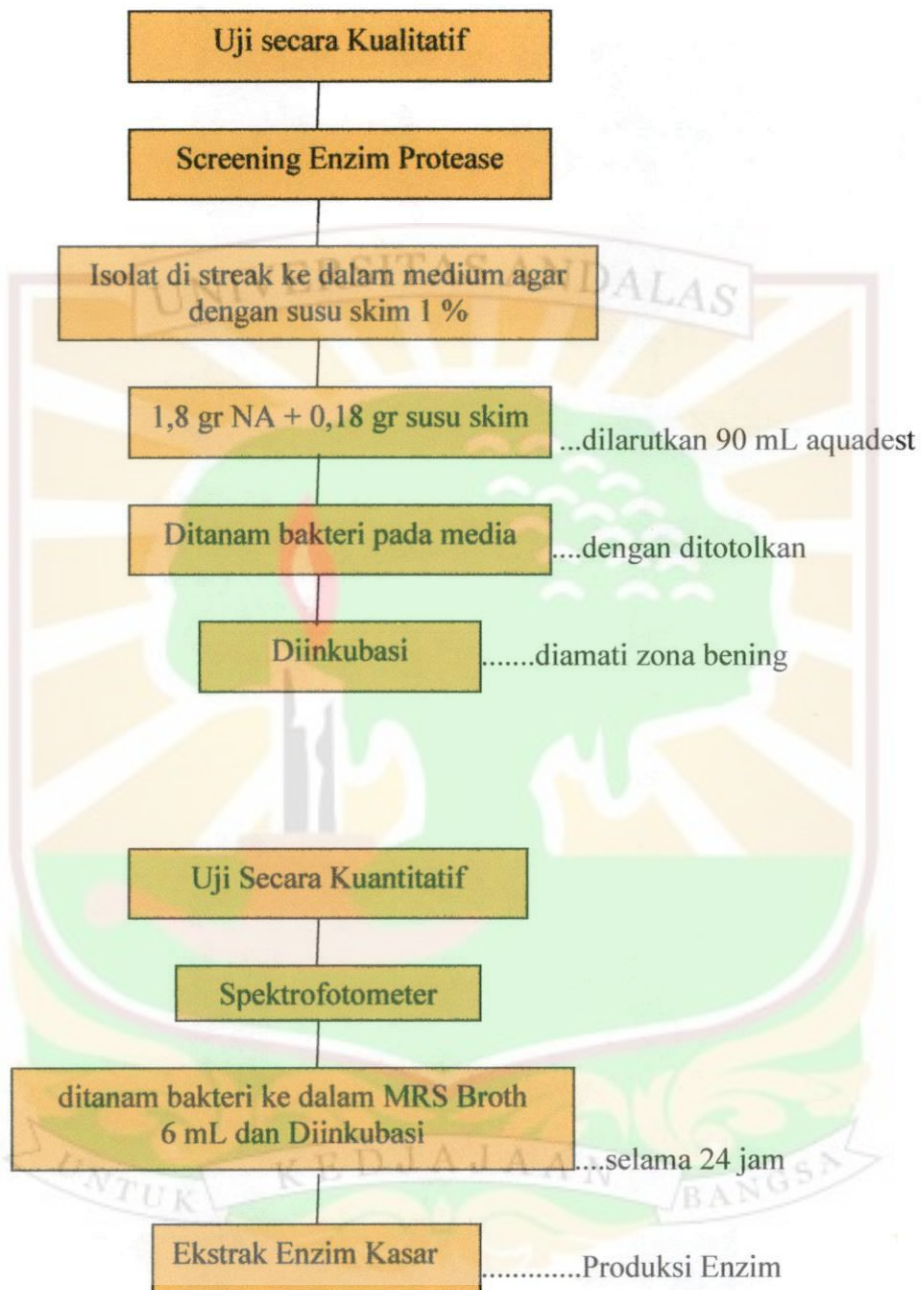


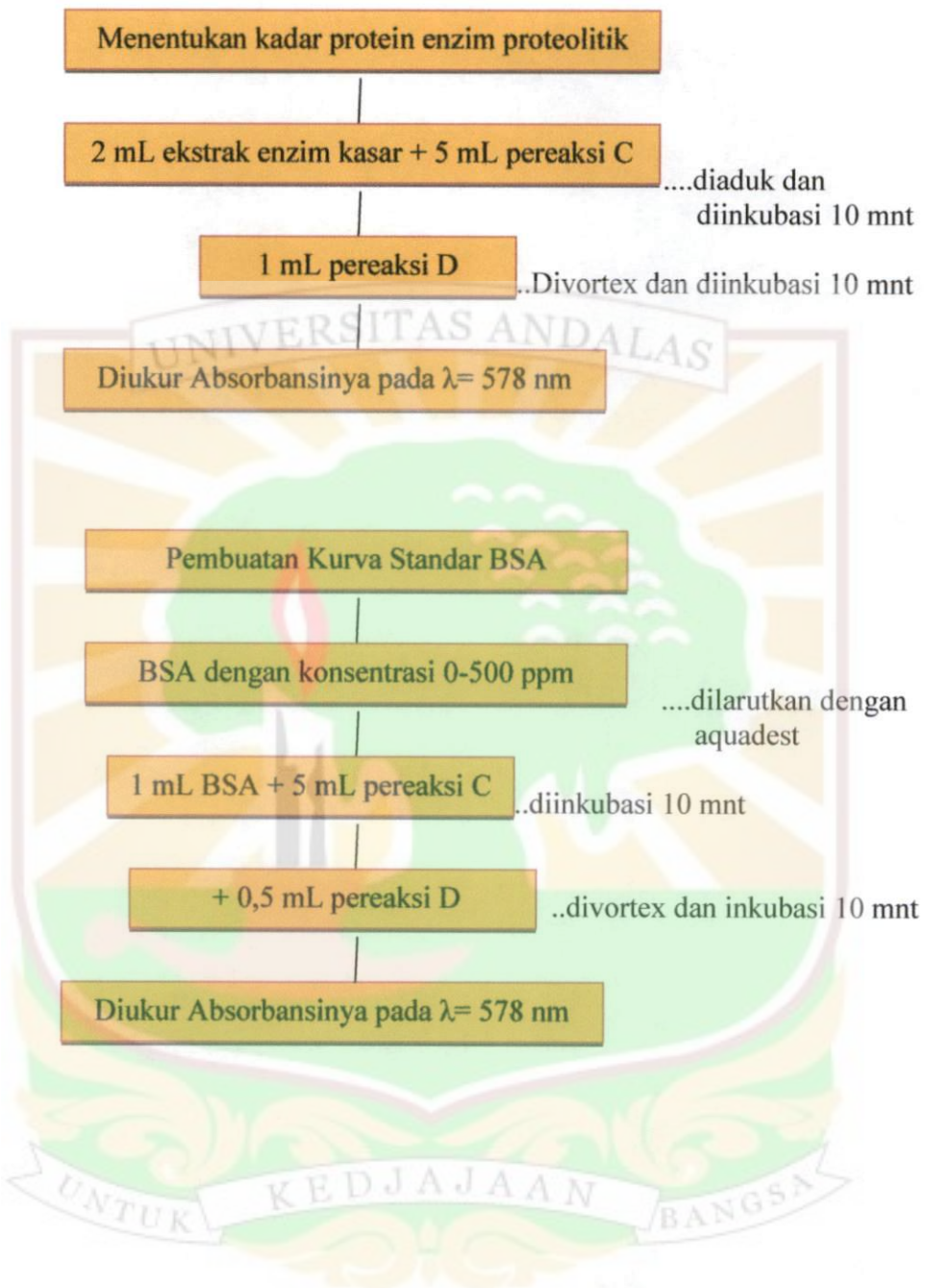


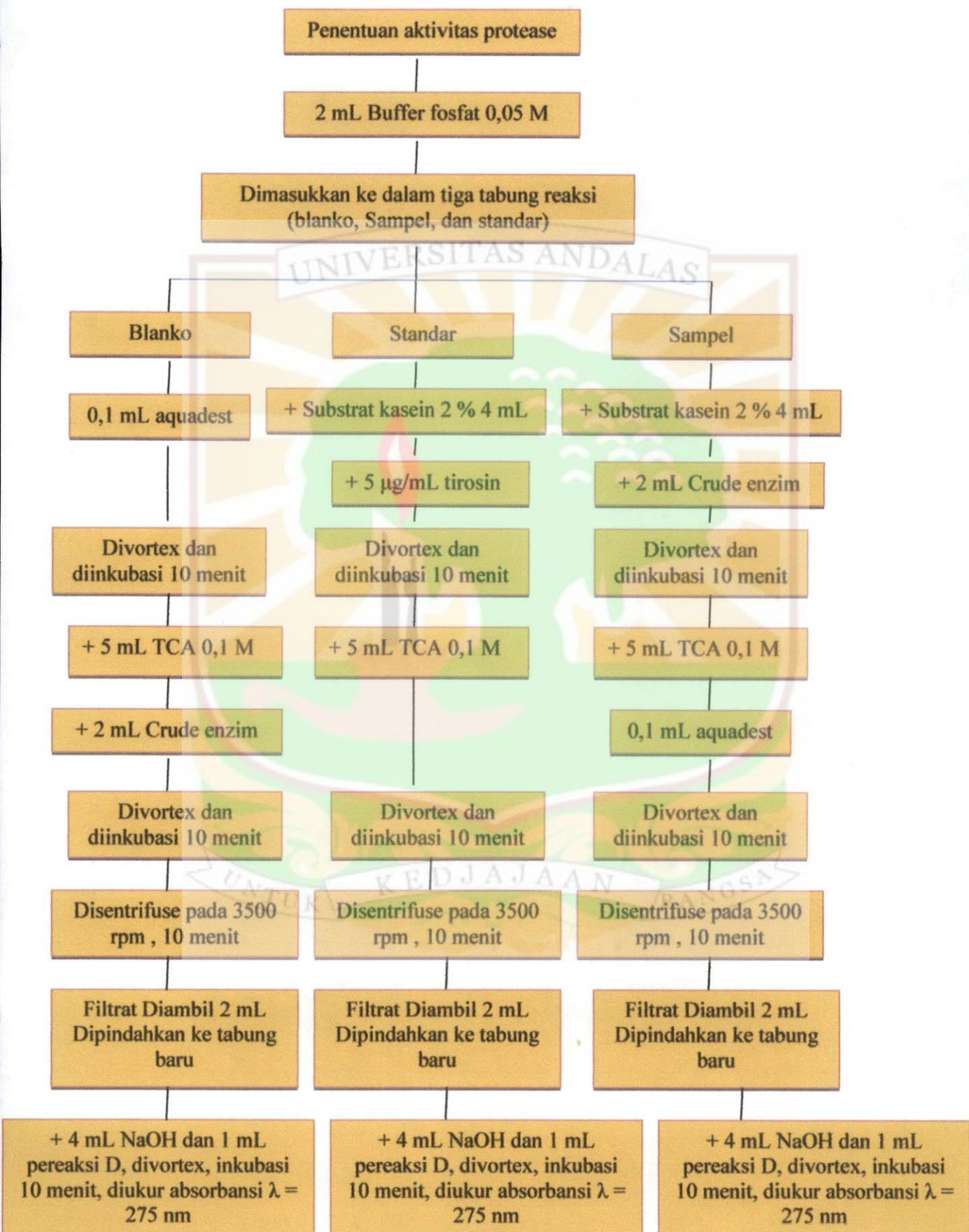
Identifikasi Morfologi BAL (Bakteri Asam Laktat)



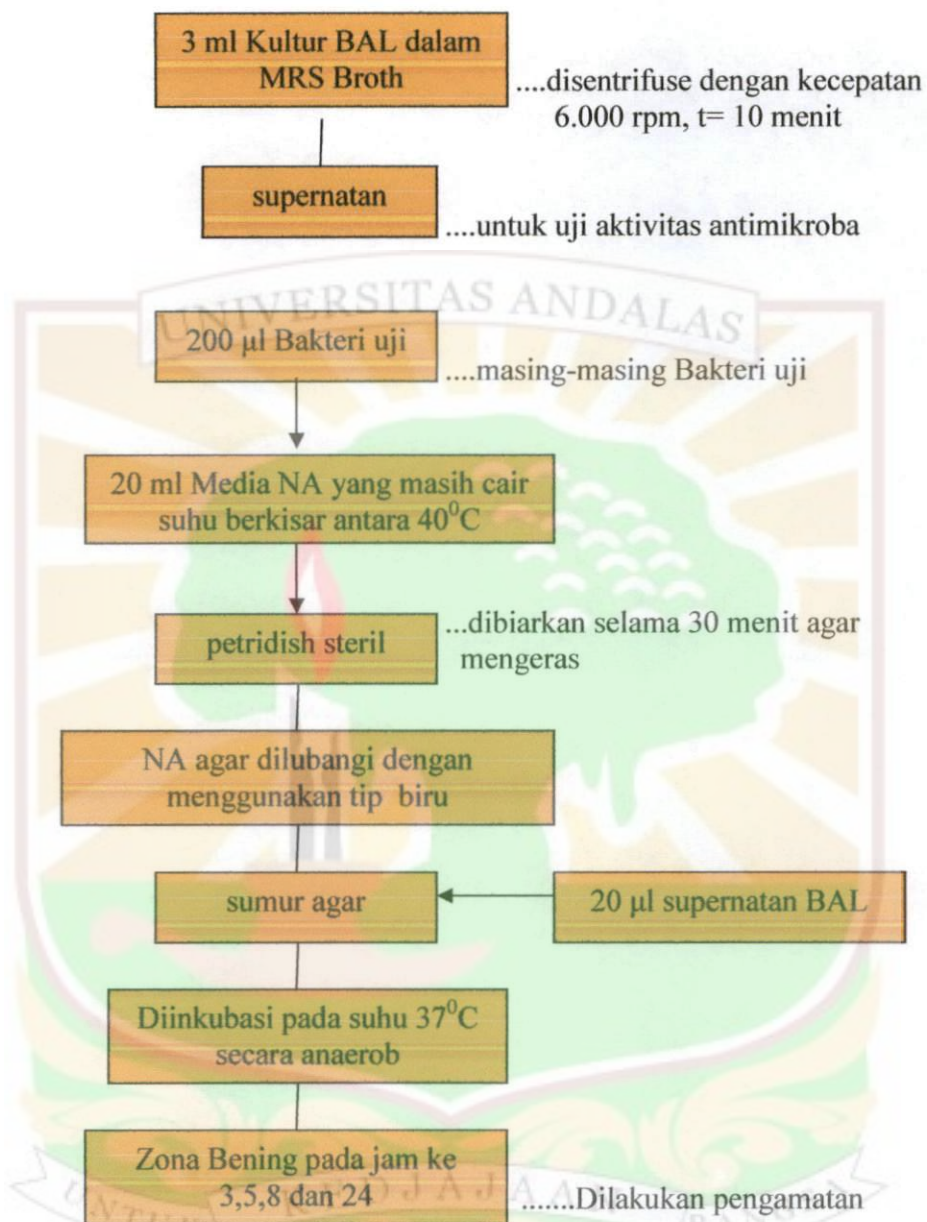
Aktivitas Enzim

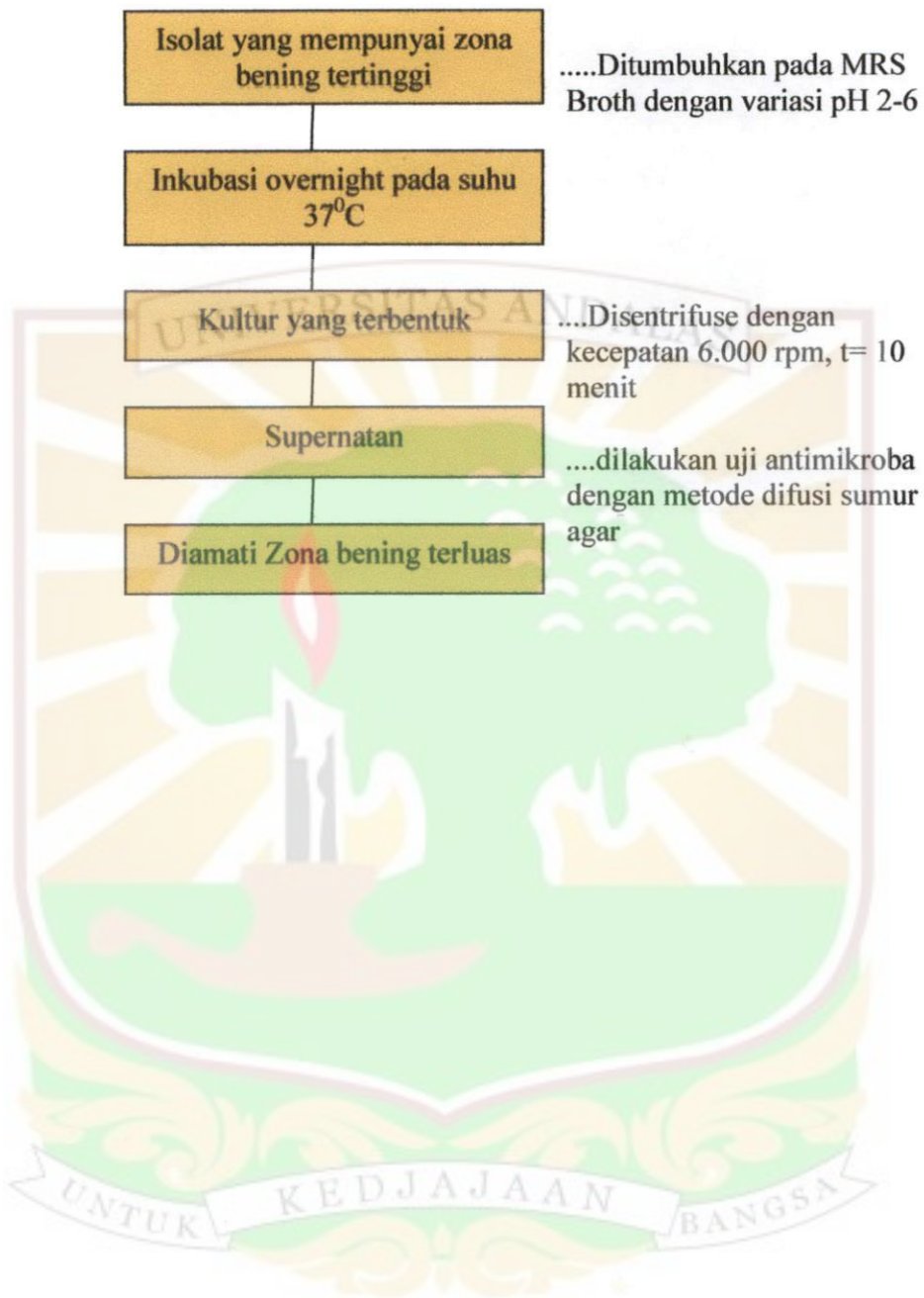




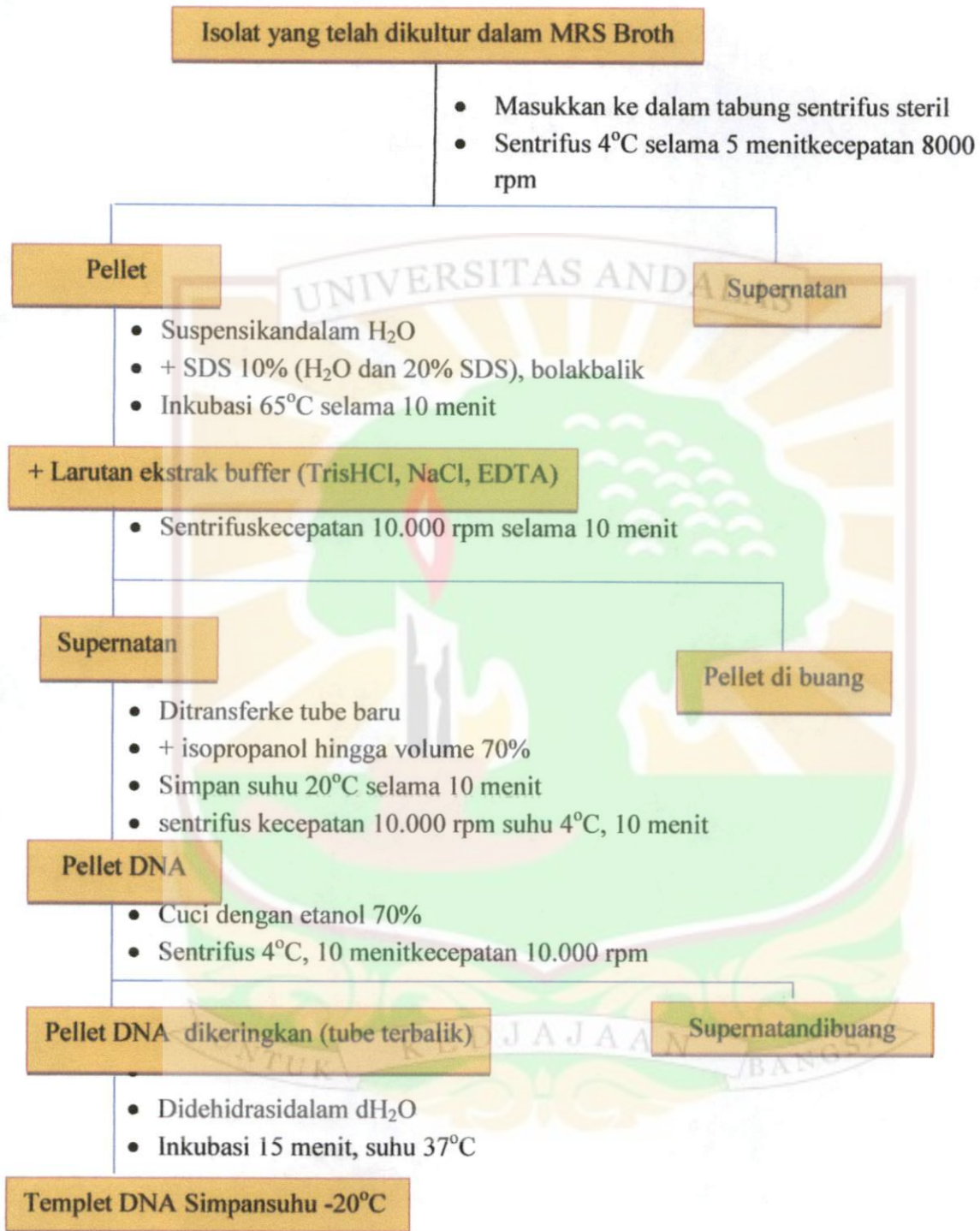


Uji Aktivitas Antimikroba



Resistensi terhadap pH

Isolasi DNA



Lampiran 2

Pengamatan Morfologi Bakteri

No.	Isolat	Ukuran	Bentuk	Elevasi	Bentuk Pinggir	Warna	Uji gram
1.	M1	Besar dan Kecil	Teratur (sirkular)	Cembung	Bulat Penuh	Putih	Kokus (gram +)
2.	M2	Besar	Sirkular	Cembung	Bulat Penuh	Putih	Basil (gram +)
3.	M3	Kecil	Rizoid dan Tidak teratur	Datar	Bergerigi Tajam	Putih	Basil (gram +)
4.	M4	Sedang	Sirkular	Cembung	Bulat Penuh	Putih dan Putih Kekuningan	Basil (gram +)
5.	M5	Kecil	Sirkular dan Rizoid	Raised	Lobate	Putih	Basil (gram +)
6.	M6	Kecil	Teratur (sirkular)	Cembung	Bulat Penuh dan Bergerigi tajam	Putih	Basil (gram +)

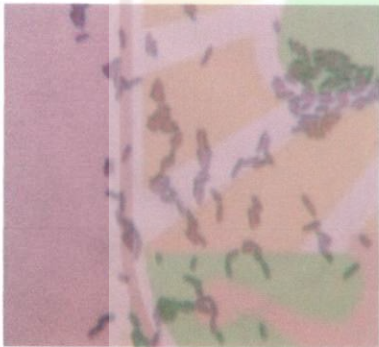
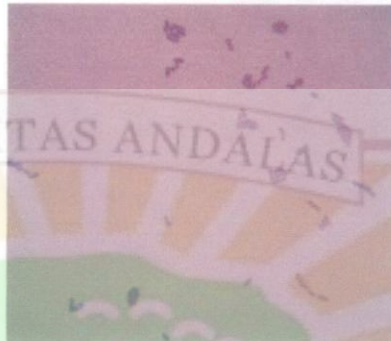
Lampiran 3

Foto Pewarnaan Gram Isolat

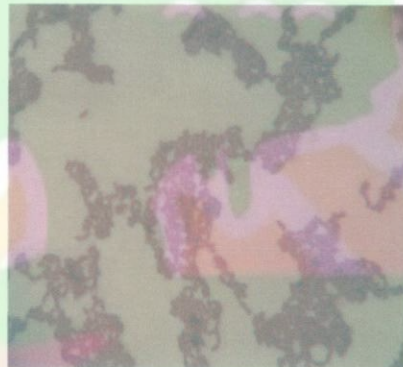
Isolat M₁



Isolat M₂



Isolat M₃



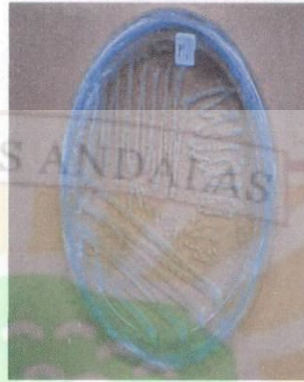
Isolat M₄



Isolat M₅



Isolat M₆

Lampiran 4**Hasil Streak Metode gores Isolat Markisa Dalam MRS agar**Isolat M₁Isolat M₂Isolat M₃Isolat M₄Isolat M₅Isolat M₆

Lampiran 5

Pengamatan Zona Bening pada Uji Aktivitas AntiMikroba

No.	Isolat	E.coli			Pseudomonas		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M ₁	8 mm	8 mm	9 mm	11,5mm	10mm	10mm
2.	M ₂	8 mm	8 mm	8,5 mm	8 mm	8,5mm	10mm
3.	M ₃	7,5 mm	7,5 mm	8 mm	8,25mm	9,25mm	8mm
4.	M ₄	9,25 mm	9 mm	9 mm	9,75mm	10,75mm	10mm
5.	M ₅	8,25 mm	9 mm	8,5 mm	8,25mm	10mm	10mm
6.	M ₆	8 mm	8 mm	8,5 mm	9 mm	10,5mm	9,75mm

No.	Isolat	Streptococcus			Stapillococcus		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M ₁	10,75 mm	11 mm	11 mm	9,5mm	9 mm	8 mm
2.	M ₂	8,75 mm	11,5mm	10,25mm	11 mm	10,25mm	8,75 mm
3.	M ₃	9 mm	9 mm	9,25 mm	9,25mm	8 mm	7,25 mm
4.	M ₄	8,25 mm	9 mm	9 mm	12,25mm	11 mm	9,5 mm
5.	M ₅	10,75 mm	10 mm	7,75 mm	9,25mm	9 mm	8,5 mm
6.	M ₆	9 mm	8,25mm	7,5 mm	9 mm	9 mm	8,25 mm

Lampiran 6

Data Pembuatan Kurva Standar BSA (Brovine Serum Albumin) Pada Panjang

Gelombang 578 nm

Dengan Menggunakan Metode Lowry

N0.	Kadar BSA X (ppm)	Absorban Y	X ²	Y ²	XY
1	0	0,000	0	0,0000	0,000
2	100	0,203	10000	0,0412	20,30
3	200	0,331	40000	0,1096	66,20
4	300	0,392	90000	0,1536	117,60
5	400	0,483	160000	0,2333	193,20
6	500	0,738	250000	0,5446	369,00
$\eta=6$	$\sum X = 1500$	$\sum Y = 2,147$	$\sum X^2 =$ 550000	$\sum Y^2 =$ 1,0823	$\sum XY =$ 766,30

Dimana : X = Konsentrasi BSA

Y = Absorbansi

Persamaan garis regresi : $Y = a + bX$

$$b = \frac{\eta(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\eta(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6(766,30) - (1500)(2,147)}{6(550000) - (1500)^2}$$

$$= \frac{4597,8 - 3220,5}{3300000 - 2250000}$$

$$= \frac{1377,30}{1050000}$$

$$= 0,0013117143$$

$$= 0,001312$$

$$a = \frac{\sum Y - b \cdot \sum X}{\eta}$$

$$= \frac{2,147 - 0,001312 \cdot 1500}{6}$$

$$= \frac{2,147 - 1,968}{6}$$

$$= \frac{0,179}{6}$$

$$= 0,0298333333$$

 η

$$= \frac{2,147 - 0,001312 \cdot (1500)}{6}$$

6

$$= \frac{2,147 - 1,968}{6}$$

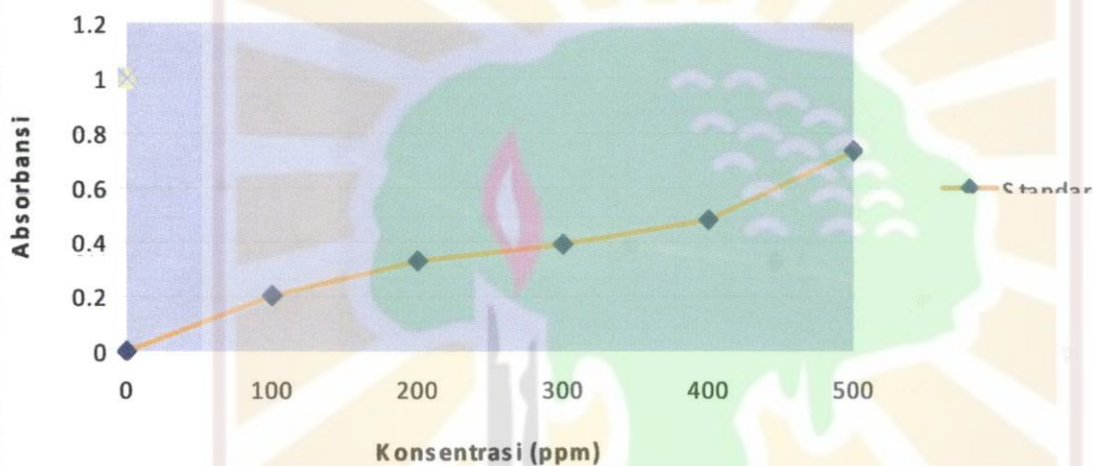
6

$$= 0,0298333333 = 0,02983$$

Persamaan Regresi : $Y = a + bX$

$$= 0,02983 + 0,001312 X$$

Kurva Standar BSA Yang Diperoleh



Perhitungan Kadar Protein Sampel :

Sampel M_1 dengan Absorbansi 0,883

$$Y = a + bX$$

$$0,883 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,883 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,883 - 0,02983 = 0,001312 X$$

$$0,85317 = 0,001312 X$$

$$X = \frac{0,85317}{0,001312} = 650,28201 \text{ ppm}$$

$$\text{Kadar Protein} = 650,28201 \text{ ppm} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL}$$

$$= 650,28201 \text{ mg} / 1 \text{ L} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL}$$

$$= 0,650282 \text{ mg} / \text{mL}$$

Sampel M₂ dengan Absorbansi 0,802

$$Y = a + bX$$

$$0,802 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,802 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,802 - 0,02983 = 0,001312 X$$

$$0,77217 = 0,001312 X$$

$$X = \frac{0,77217}{0,001312}$$

$$X = 588,544 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein} &= 588,544 \text{ ppm} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} \\ &= 588,544 \text{ mg/1 L} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} \\ &= 0,588544 \text{ mg/ mL} \end{aligned}$$

Sampel M₄ dengan Absorbansi 0,895

$$Y = a + bX$$

$$0,895 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,895 = 0,02983 + 0,001312 X$$

$$0,895 - 0,02983 = 0,001312 X$$

$$0,86517 = 0,001312 X$$

$$X = \frac{0,86517}{0,001312}$$

$$X = 659,4283 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein} &= 659,4283 \text{ ppm} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} \\ &= 659,4283 \text{ mg/1 L} \times 1 \text{ L} / 1000 \text{ mL} \\ &= 0,65943 \text{ mg/ mL} \end{aligned}$$

Kadar Protein Sampel

NO.	Sampel	Absorban	Kadar Protein
1.	M ₁	0,883	0,65023 mg/mL
2.	M ₂	0,802	0,58854 mg/mL
3.	M ₃	0,895	0,65943 mg/mL

Lampiran 7

Aktivitas Enzim Dan Aktivitas Spesifik Enzim Protease

No	Sampel	Absorban Blanko	Absorban Sampel	Absorban Standar	Aktivitas Enzim (Unit/mL)	Aktivitas spesifik (Unit/mg)
1.	M ₁	0,218	0,919	0,701	0,72567 Unit/mL	1,11594 Unit/mg
2.	M ₂	0,164	0,856	0,633	0,6553 Unit/mL	1,1134 Unit/mg
3.	M ₄	0,285	0,963	0,678	0,8626 Unit/mL	1,3081 Unit/mg

Perhitungan :

$$U = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times \frac{1}{T} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

untuk M₁

$$U = \frac{0,919 - 0,218}{0,701 - 0,218} \times \frac{1}{10 \text{ menit}} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= \frac{0,701}{0,483} \times 0,1 \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= 1,45135 \times 0,1 \times 5 \mu\text{g/mL} = 0,72567 \text{ Unit/mL}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Aktivitas (Unit/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}}$$

$$= \frac{0,72567 \text{ Unit/mL}}{0,6503 \text{ mg/mL}}$$

$$= 1,11594 \text{ Unit/mg}$$

untuk M₂

$$U = \frac{0,856 - 0,164}{0,692 - 0,164} \times \frac{1}{10 \text{ menit}} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= \frac{0,692}{0,528} \times 0,1 \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= 0,6553 \text{ Unit/mL}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Aktivitas (Unit/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}}$$

$$= \frac{0,6553 \text{ Unit/mL}}{0,58854 \text{ mg/mL}}$$

$$= 1,1134 \text{ Unit/mg}$$

untuk M_4

$$U = \frac{0,963-0,285}{0,678-0,285} \times \frac{1}{10 \text{ menit}} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= \frac{0,678}{0,393} \times 0,1 \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$= 1,7252 \times 0,1 \times 5 \mu\text{g/mL} = 0,8626 \text{ Unit/mL}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Aktivitas (Unit/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}}$$

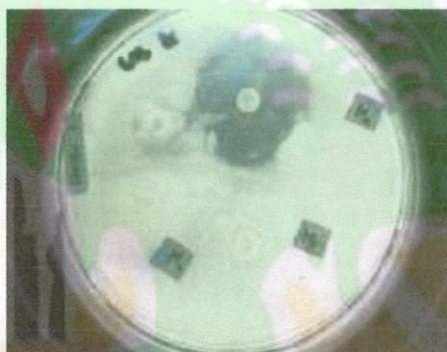
$$= \frac{0,8626 \text{ Unit/mL}}{0,65943 \text{ mg/mL}}$$

$$= 1,3081 \text{ Unit/mg}$$



Lampiran 8

Foto Uji Aktivitas AntiMikroba



Lampiran 9

Warna larutan isolat Saat Resistnsi terhadap asam (pH)

No	Isolat	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
1.	M1	++	+	+	+++	+++
2.	M2	+	++	+++	++	+++
3.	M4	+++	+++	+	+	+++

Keterangan : Kontrol : Bening (coklat Bening)

+ : Kurang keruh

++ : Keruh

+++ : Sangat keruh



Lampiran 10

Uji Resistensi Terhadap Asam

1. Bakteri *E.coli*

No	Isolat	pH 2			pH 3			pH 4			pH 5			pH 6		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M1	7,5 mm	11,5 mm	11 mm	7,75 mm	9 mm	10 mm	8,5 mm	11 mm	8,5 mm	7,75 mm	8,5 mm	8,25 mm	9,5 mm	10,5 mm	9,5 mm
2.	M2	8 mm	15 mm	9 mm	8 mm	10,5 mm	8 mm	8,5 mm	10,5 mm	8 mm	8,5 mm	10 mm	8,5 mm	8,5 mm	11,5 mm	9 mm
3.	M4	11 mm	11,5 mm	10 mm	10 mm	10,5 mm	9,5 mm	10 mm	10,5 mm	10 mm	11 mm	10,5 mm	9 mm	8,5 mm	10,5 mm	9,5 mm

2. Bakteri *Pseudomonas*

No	Isolat	pH 2			pH 3			pH 4			pH 5			pH 6		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M2	8 mm	11 mm	9,5 mm	8,75 mm	13,5 mm	8,5 mm	7,25 mm	11,5 mm	8 mm	7,25 mm	12 mm	7,75 mm	8, mm	11,5 mm	8,5 mm
2.	M4	8,75 mm	11 mm	9 mm	10 mm	10,5 mm	10 mm	10 mm	12 mm	11 mm	9 mm	10 mm	10,5 mm	8, mm	11,5 mm	10 mm

3. Bakteri Stapilococcus

No	Isolat	pH 2			pH 3			pH 4			pH 5			pH 6		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M1	9 mm	16,5 mm	9,5 mm	9,75 mm	10 mm	9,5 mm	8,75 mm	14,5 mm	8,5 mm	8 mm	10 mm	9 mm	8,25 mm	12 mm	10,25 mm
2.	M2	10 mm	14 mm	15 mm	9 mm	11 mm	12 mm	9 mm	10 mm	10,5 mm	10 mm	10 mm	15 mm	9 mm	11 mm	10,5 mm
3.	M4	10 mm	15 mm	13 mm	9,75 mm	13 mm	13 mm	8,75 mm	14,5 mm	15 mm	9 mm	10,5 mm	10 mm	9,75 mm	11 mm	9,5 mm

4. Bakteri Streptococcus

No	Isolat	pH 2			pH 3			pH 4			pH 5			pH 6		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
1.	M1	8,75 mm	11 mm	10 mm	8 mm	9 mm	7 mm	8 mm	11 mm	7,5 mm	7 mm	11 mm	9 mm	7 mm	10 mm	8 mm
2.	M2	9 mm	10 mm	9,5 mm	9 mm	10 mm	7,5 mm	8 mm	10 mm	8 mm	8 mm	10 mm	8 mm	8 mm	11,5 mm	8 mm
3.	M4	8,5 mm	10 mm	9,5 mm	8,5 mm	8,5 mm	8,5 mm	8,75 mm	8 mm	7 mm	9,5 mm	10,5 mm	8 mm	8 mm	10 mm	9,5 mm

Lampiran 11

Urutan Basa-Basa Nitrogen sampel Isolat M₄

>SAMPEL M4

GCCCCGCTCCAGGTGGGCTATACATGCAGTCGACGCTTTGTGGTTCAACTGAT
TTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAAC
AGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTGAAAGAT
GGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCC GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAG
GTAATGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGC
CACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGA
AGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTA
ACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAAC
TGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTTTCTGGACTGTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGGT
GTTTGAGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCT
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGNATTGACGGGGACCCGCAC
AGCGTGGAGCATG



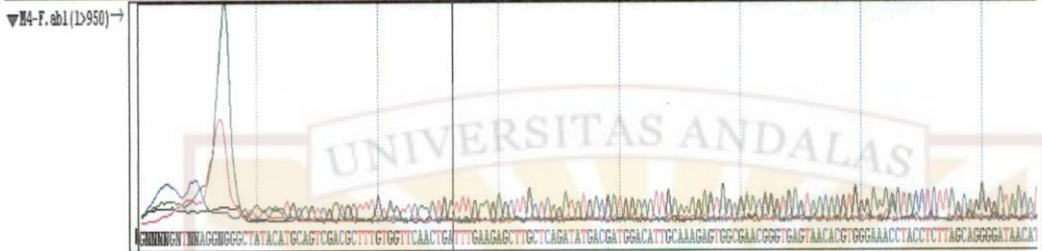
Lampiran 12

Hasil Sekuensing

Position: 53 91

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 1

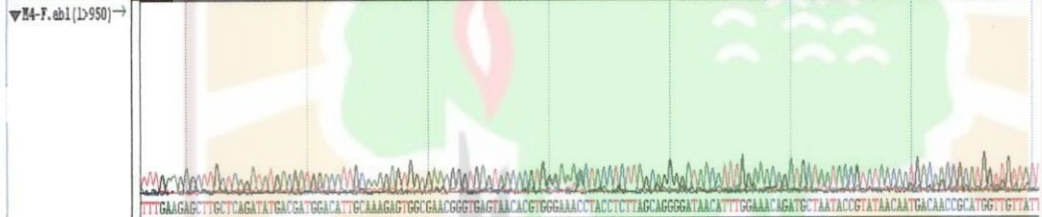
Translate **GHNNNGTNNAGNNGGCTATACATGCACTGCAACCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGACATTCGAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACTGCGAAACCTACTCTTAGCAGGGGATAACAT**



Position: 206 91

60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

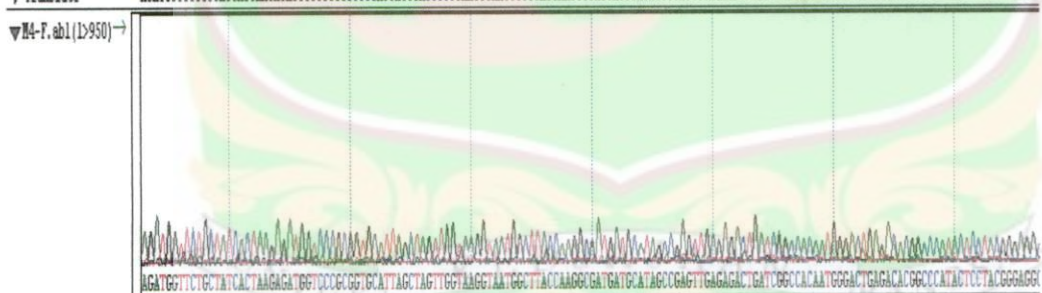
Translate **TTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGACATTCGAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACACTGCGAAACCTACTCTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCCCATGGTGTATT**



Position: 359 91

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350

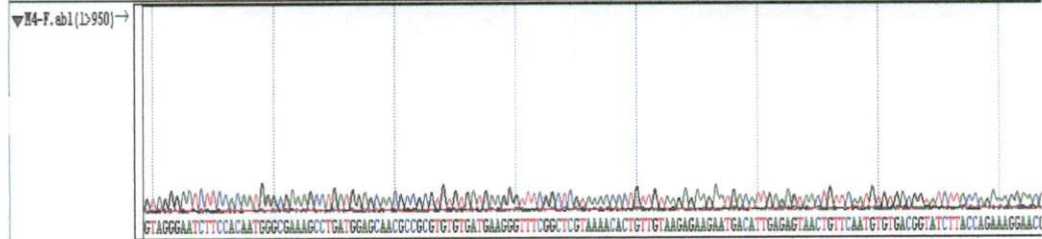
Translate **AGATGGTTCTGCTATCTAAGAGATGGTCCCGGGTGCATTAGCTAGTGGTAAAGGTAAAGGTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTCAGAGACTGATCGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCTACGGGAGG**



Position: 512 91

360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

Translate **GTAGGGAATCTCCACAATGGCGAAAGCTGATGGACCAACCCCGCTGTGTGATGAAGGTTTCGGCTGTAAACACTGTGTGAAGAGAAGATGACATTCAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAAC**

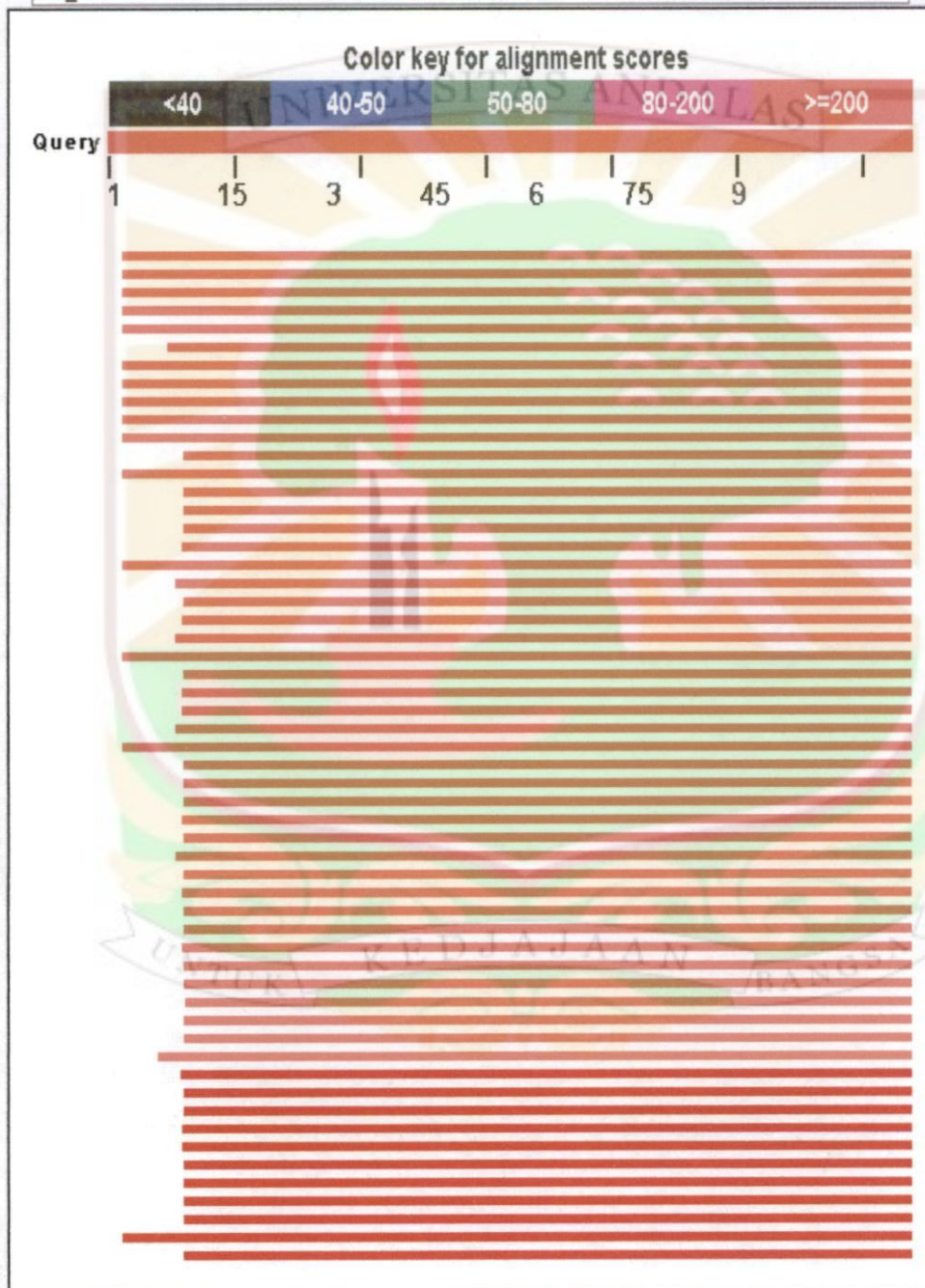


Lampiran 13

Hasil BLAST

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

NR_029085 Lactobacillus saerimneri strain GDA154 16S ribosomal RN.. S=1026 E=0



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NR_036924.1	<i>Weissella cibaria</i> strain II-1-59 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ295989.1 Weiss	1639	1639	98%	0.0	98%	
NR_029041.1	<i>Weissella koreensis</i> strain S-5623 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY035891.1 Wei	1461	1461	98%	0.0	94%	
NR_025642.1	<i>Weissella soli</i> strain M268 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY028260.1 Weissella sc	1452	1452	98%	0.0	94%	
NR_036788.1	<i>Lactobacillus pontis</i> strain LTH 2587 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X76329.1 Lp	1127	1127	98%	0.0	88%	
NR_026310.1	<i>Lactobacillus panis</i> strain DSM 6035 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X94230.1 Lc	1105	1105	98%	0.0	88%	
NR_029014.1	<i>Lactobacillus rossiae</i> strain CS1 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ564009.1 Lacti	1098	1098	92%	0.0	89%	
NR_029084.1	<i>Lactobacillus gastricus</i> strain Kx156A7 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AY253658	1081	1081	98%	0.0	87%	
NR_025371.1	<i>Lactobacillus frumenti</i> strain TMW 1.666 16S ribosomal RNA, complete sequence >emb AJ2500	1081	1081	98%	0.0	87%	
NR_027206.1	<i>Lactobacillus antri</i> strain Kx146A4 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY253659.1 Lact	1074	1074	98%	0.0	87%	
NR_026309.1	<i>Lactobacillus oris</i> strain DSM 4864 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X94229.1 Lori	1074	1074	98%	0.0	87%	
NR_024994.1	<i>Lactobacillus mucosae</i> strain CCUG 43179 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF126	1066	1066	98%	0.0	87%	
NR_025719.1	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i> strain CCUG 34545 16S ribosomal RNA, partial sequence >	1059	1059	98%	0.0	89%	
NR_028810.1	<i>Lactobacillus ingluviæ</i> strain KR3 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF333975.1 Lacto	1055	1055	98%	0.0	87%	
NR_028777.1	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> strain TB1-10 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF231131	1051	1051	90%	0.0	88%	
NR_025034.1	<i>Leuconostoc kimchii</i> strain JH25 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF173965.1 AF1739	1051	1051	90%	0.0	88%	
NR_037082.1	<i>Enterococcus hirae</i> strain R 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb Y17302.1 Enterococci	1042	1042	90%	0.0	88%	
NR_036922.1	<i>Enterococcus durans</i> strain 98D 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ276354.1 Ente	1040	1040	90%	0.0	88%	
NR_037004.1	<i>Lactobacillus diolivorans</i> strain JKD6 16S ribosomal RNA, partial sequence	1038	1038	98%	0.0	86%	
NR_024645.1	<i>Lactobacillus collinoides</i> strain JCM1123 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB005893.	1037	1037	91%	0.0	88%	
NR_025035.1	<i>Leuconostoc gelidum</i> strain DSM5578 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF175402.1 L	1035	1035	90%	0.0	88%	
NR_029040.1	<i>Enterococcus phoenicicola</i> strain JLB-1 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY028437.	1033	1033	90%	0.0	88%	
NR_025579.1	<i>Lactobacillus spicheri</i> strain LTH 5753 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ354944.1	1033	1033	91%	0.0	88%	
NR_028990.1	<i>Lactobacillus versmoldensis</i> strain KU-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	1031	1031	98%	0.0	86%	
NR_025447.1	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> strain DSM 10667 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ3	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_026499.1	<i>Enterococcus raffinosus</i> strain 1789-79 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb Y18296.1	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_027051.1	<i>Enterococcus pseudovivium</i> strain 47-16 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF061002.1	1031	1031	90%	0.0	88%	
NR_025880.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> strain R094 16S ribosomal RNA, partial sequence >dt	1027	1027	91%	0.0	88%	
NR_029085.1	<i>Lactobacillus saerimneri</i> strain GDA154 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY255802.1	1026	1026	98%	0.0	86%	
NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain 124-2 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D79211.1 LBA1	1026	1026	90%	0.0	88%	
NR_028558.1	<i>Lactobacillus satsumensis</i> strain NRIC 0604 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB1545	1022	1022	90%	0.0	88%	
NR_036921.1	<i>Enterococcus villorum</i> strain 89-5474 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ271329.1	1022	1022	90%	0.0	88%	
NR_037122.1	<i>Lactobacillus zeae</i> strain R1A 482 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D86516.1 Lactob	1022	1022	90%	0.0	88%	
NR_025189.1	<i>Lactobacillus pantheris</i> strain LMG 21017 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF4135.	1020	1020	90%	0.0	88%	
NR_029039.1	<i>Lactobacillus parakefiri</i> strain GCL 1731 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY026750.1	1020	1020	91%	0.0	87%	
NR_024885.1	<i>Paralactobacillus selangorensis</i> strain LMG 17710 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF	1018	1018	90%	0.0	88%	
NR_036861.1	<i>Lactobacillus dextrinicus</i> strain JCM 5887 16S ribosomal RNA, partial sequence >dbj D87679.1	1016	1016	90%	0.0	87%	
NR_036789.1	<i>Lactobacillus fructivorans</i> strain DSM 20203 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X763:	1016	1016	90%	0.0	88%	
NR_029136.1	<i>Pediococcus parvulus</i> strain S-182 16S ribosomal RNA, partial sequence	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_028748.1	<i>Enterococcus avium</i> strain E6844 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF133535.1 AF133:	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_024906.1	<i>Enterococcus mundtii</i> strain ATCC 43186 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF061013.	1014	1014	90%	0.0	88%	
NR_025153.1	<i>Fructobacillus ficulneus</i> strain FS-1 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF360736.1 Leu	1013	1013	90%	0.0	88%	
NR_025154.1	<i>Fructobacillus fructosus</i> strain DSM 20349 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF360737	1011	1011	90%	0.0	88%	
NR_024835.1	<i>Lactobacillus manihotivorans</i> strain OND 32 16S ribosomal RNA, complete sequence >gb AF00	1011	1011	90%	0.0	87%	