



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.

**ISOLASI, PENENTUAN ANTIMIKROBIAL DAN KARAKTERISASI  
MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI BIJI KAKAO  
(Theobroma cacao Lin) ASAL SUMATERA BARAT DAN APLIKASINYA  
UNTUK MENUNJANG KESEHATAN MASYARAKAT**

**DISERTASI**



**URNEMI  
07 301 024**

**PROGRAM STUDI ILMU KIMIA PROGRAM  
PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2012**

**SURAT PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN  
SUMBER INFORMASI**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : URNEMI

Program Studi : Ilmu Kimia Pertanian

No. BP : 07 301 024

Asal Instansi : Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman, Samarinda

NIP : 1964 05 14 1993 03 2001

Alamat Asal : Komplek Perumahan PT. Badak LNG Bontang, HOP IV  
No. 113, Jl. Mataram, Bontang Kalimantan Timur

menyatakan dengan sebenarnya bahwa : Judul, isi dan data hasil penelitian di dalam proses penyusunan dan penulisan Disertasi ini merupakan hasil karya saya sendiri dengan bimbingan dan arahan dari komisi pembimbing. Sumber informasi yang dikutip dari karya yang telah diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir Disertasi ini.

Padang, Oktober 2012



URNEMI  
BP. 07 301 024

## RINGKASAN

**URNEMI. Isolasi, Penentuan Antimikrobiai dan Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* Lin) asal Sumatera Barat dan Aplikasinya Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat. Dibimbing oleh SUMARYATI SYUKUR, ENDANG PURWATI RN, SANUSI IBRAHIM dan JAMSARI.**

Dua rangkaian penelitian telah dilakukan. Pertama "Isolasi, Penentuan Aktivitas Antimikrobiai dan Karakterisasi Molekuler Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Fermentasi Kakao (*Theobroma cacao* Lin) Sumatera Barat dan Aplikasinya untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan aktivitas antimikrobiai dari BAL untuk menemukan BAL yang berpotensi sebagai probiotik yang potensial untuk digunakan sebagai makanan suplemen. Kedua, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aplikasi BAL potensial pada uji biologis terhadap hewan percobaan dan mendapatkan dosis optimum dari probiotik dalam menurunkan kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah.

Hasil penelitian tahap I, diperoleh 66 isolat dari fermentasi biji kakao di Sumatra Barat. Selanjutnya hasil uji karakteristik BAL dengan menggunakan medium spesifik *de Man Ragosa Sharpe* (MRS) dan uji mikrobiologi, ditemukan koloni BAL putih mengkilat, permukaan koloni cembung, pinggiran koloni halus, warna koloni mengkilat seperti susu. Uji pewarnaan Gram ditemukan bakteri Gram positif, berbentuk batang atau kokus.

Uji skrining dari 66 isolat BAL terhadap aktifitas antimikrobiai lima bakteri patogen indikator yaitu (*Escherichia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Bacillus subtilis* BTCCB, *Salmonella thypii* dan *Listeria monocytogenesis*), ditemukan 5 isolat BAL potensial memiliki zona hambat yang tinggi dari kakao varietas (*Criollo*, *Forestero* dan *Trinitario*). Kelima isolat tersebut diberi kode sesuai asal varietas dan hari fermentasi, yaitu Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3. Isolat yang berasal dari varietas *Trinitario* fermentasi 3 hari (Hb3.3), memperlihatkan aktivitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dengan diameter zona hambatnya mencapai 32.5 mm terhadap *Listeria monocytogenesis*, *Salmonella typhosa* dan *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, dan 30.0 mm terhadap *Escherichia coli* NBRC 14237 dan *Bacillus subtilis* NBRC 3134. Diameter zona hambat tertinggi kedua terhadap pertumbuhan bakteri patogen indikator adalah Isolat R2.4 dari varietas *Forestero*, dengan diameter zona hambat 30 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Escherichia coli* NBRC 14237 dan *Listeria monocytogenesis*,

Isolat (Hb3.3) dipilih sebagai BAL potensial tertinggi sebagai probiotik, untuk dilanjutkan kepada uji karakterisasi biokimia, parsial purifikasi bakteriosin dan juga diaplikasikan kepada uji biologis terhadap penurunan kadar kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah. Karakterisasi stabilitas pH, stabilitas suhu, isolat Hb3.3 stabil mulai pH 4 sampai pH 6.5 dengan aktivitas antimikrobiai terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu 17.5 mm sampai 32,5 mm. Uji stabilitas suhu, memperlihatkan kestabilan yang kuat terhadap suhu tinggi pada 121°C selama 60 menit. Kurva pertumbuhan (optikal densiti) isolat

Hb3.3 mulai 6 jam sampai 16 jam menunjukkan fase eksponensial (*exponential phase*)/fase produksi (*production phase*), kemudian mulai 16 jam sampai 18 jam adalah fase stasioner, pada fase ini tidak adanya pertumbuhan BAL (jumlah BAL yang tumbuh sama dengan jumlah BAL yang mati) dan mengalami kematian sampai 28 jam.

Purifikasi parsial bakteriosin dan aktivitas antimikrobal dilakukan dengan presipitasi 80 % ammonium sulfat. Determinasi bobot molekul bakteriosin dilakukan dengan metoda *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacril Amide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE), hasilnya diperkirakan sekitar 10 kDa protein, dan dikelompokkan kepada bakteriosin golongan II. Ekstrak (*supernatant*) dari bakteriosin juga telah diuji terhadap *Listeria*, memperlihatkan zona hambat yang sangat kuat dan stabil terhadap temperatur tinggi pada 121° C.

Lima isolat BAL yang potensial (Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3) diidentifikasi dengan menggunakan 16S rRNA. Hasil identifikasi spesies BAL menunjukkan isolat Gr2.3 memiliki kesamaan 99% dengan *Lactobacillus plantarum* subsp, isolat Gr3.7 memiliki kesamaan 90% dengan *Pediococcus pentosaceus*, Hb2.11 memiliki kesamaan 99% dengan *Pediococcus pentosaceus*, Hb3.3 memiliki kesamaan 98% dengan *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, sedangkan isolat R2.4 memiliki kesamaan 97% dengan *Pediococcus acidilactici* 7\_4 cont 1.26. Sebagai kandidat probiotik potensial adalah *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 dengan kode isolat Hb3.3.

Hasil penelitian tahap kedua, dilakukan studi aplikasi probiotik Hb3.3 (*Pediococcus pentosaceus*) ATCC 25745 untuk menurunkan kadar kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 2 ml ( $25.4 \times 10^8$  CFU/g) *Pediococcus pentosaceus* ATCC melalui oral dapat penurunan kadar kolesterol daging itik Pitalah dari 39.2266, mg/dl (tanpa pemberian probiotik sebagai kontrol), menjadi 32,6566 mg/dl turun sekitar 17 % dibanding kontrol. Pada pemberian dosis 3 ml ( $38.1 \times 10^8$  CFU/g) dapat menurunkan kadar trigliserida (kuning + putih) telur itik Pitalah dari 258.01 mg/dl menjadi 73.32 mg/dl, turun 71.58 % trigliserida dari kontrol. Dosis 2 ml dosis dari probiotik efektif untuk menurunkan kolesterol daging itik Pitalah dan dosis 3 ml adalah merupakan dosis yang efektif untuk menurunkan trigliserida telur itik Pitalah.



## SUMMARY

**URNEMI.** Isolation, Determination of Antimicrobial Activity and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Cacao (*Theobroma cacao* Lin) Fermentation In West Sumatra and Application To Support Public Health, under supervisors of **SUMARYATI SYUKUR, ENDANG PURWATI RN, SANUSI IBRAHIM and JAMSARI.**

Two series of research have been conducted, First "Isolation, Determination of Antimicrobial Activity and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Cacao (*Theobroma cacao* Lin) fermentation in West Sumatra and application to support Public Health. This research aimed to study Isolation and Antimicrobial activity of LAB and to obtain potential lactic acid bacteria as potential probiotic to be used as food supplement. Secondly, this research aimed studied the application of potential LAB by using animal biological experiment and to figure out the optimum doses of probiotic in order to decrease the Cholesterol and Triglyceride level of egg from Pitalah duck .

The result of the first investigation were found, 66 of selected isolates derive from Cacao beans fermentation in West Sumatra. The characteristic of LAB were studied by using specific *de Man Ragosa Sharpe* MRS medium and microbiological test. The colonies of LAB which is form of turning white brass, convex surface, smooth boundary, and its color were gleam milkly. The Gram test, were found positive Gram bacteria, in form bacillus and circle or coccus.

The antimicrobial activity study were used for screening 66 LAB isolates to inhibited growth of five indicator pathogenic bacteria such as (*Escherichia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Bacillus subtilis* BTCCB, *Salmonella thypii* dan *Listeria monocytogenesis*). There were found five potential LAB isolates that were high inhibition zone derive from three varieties of Cacão (Red Criollo, Green Forestero and Hybride Trinitario). Five isolates were given by code according fermented days and varieties. The Isolates were Gr2.3, Gr3.7. R2.4, Hb2.11 and of Hb3.3. The Hb3.3 isolate was coming from *Trinitario* variety and 3 days fermentation, showed the highest activities to inhibited growth of pathogenic bacteria, with the diameter zone average of 32,5 mm agains *Listeria monocytogenesis*, *Salmonella thypii* and *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, and 30 mm to *Escherichia coli* NBRC 14237 and *Bacillus subtilis* BTCCB. The second higher to inhibited growth of pathogens indicators, it was R2.4 Isolate of *Forestero* variety, with diameter zone of inhibition about 30 mm to *Bacillus subtilis* BTCCB, *Escherichia coli* NBRC 14237 and *Listeria monocytogenesis*.

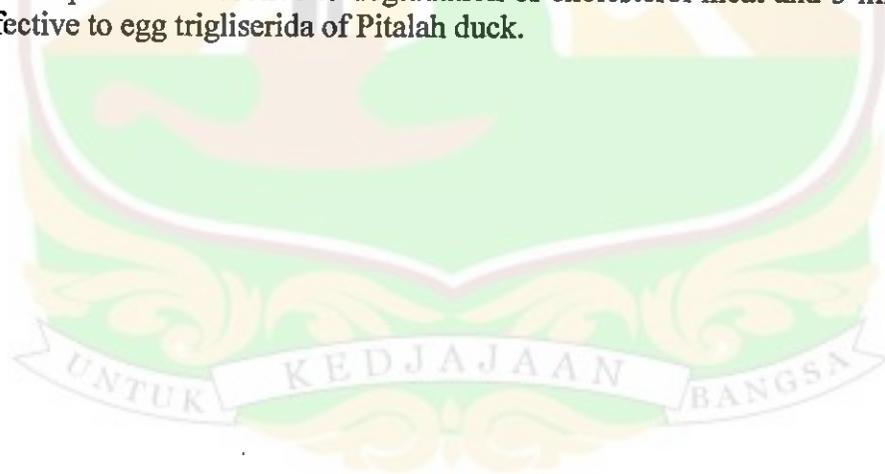
The Isolate (Hb3.3) was chosen as high potential LAB as probiotic and it was continued for further biochemical characterization, partially purification of bacteriocin and also was studied to apply to lower the cholesterol meat and tryglicéride of egg came from Pitalah duck. The characterization of pH stability and temperature stability were studied, it was start from pH 4 until pH 6.5, where antimicrobial activity studied agains pathogenic bacteria showed inhibition zones was 17,5 mm until 32,5 mm, the temperature stability studied showed that the Hb3.3 isolate were strongly stabled at 121°C during 60 minute. The optical density start 6 hours until 16 hours (exponential phase) or (production phase).

Next start 16 hours until 18 hours were stationer phase (stop growth phase) and down hill until 28 hour.

Partially purification of Antimicrobial bacteriocin done by precipitation using 80 % of ammonium sulfate. Determination of molecular weight of bacteriocin was done by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacril Amide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) method. The results was estimated 10 kDa protein, and probably It was classified belong to class II of bacteriocin. The extract of bacteriocin was also studied agains *Listeria* and performed strongly inhibition zone and showed high temperature stability at 121<sup>o</sup>C.

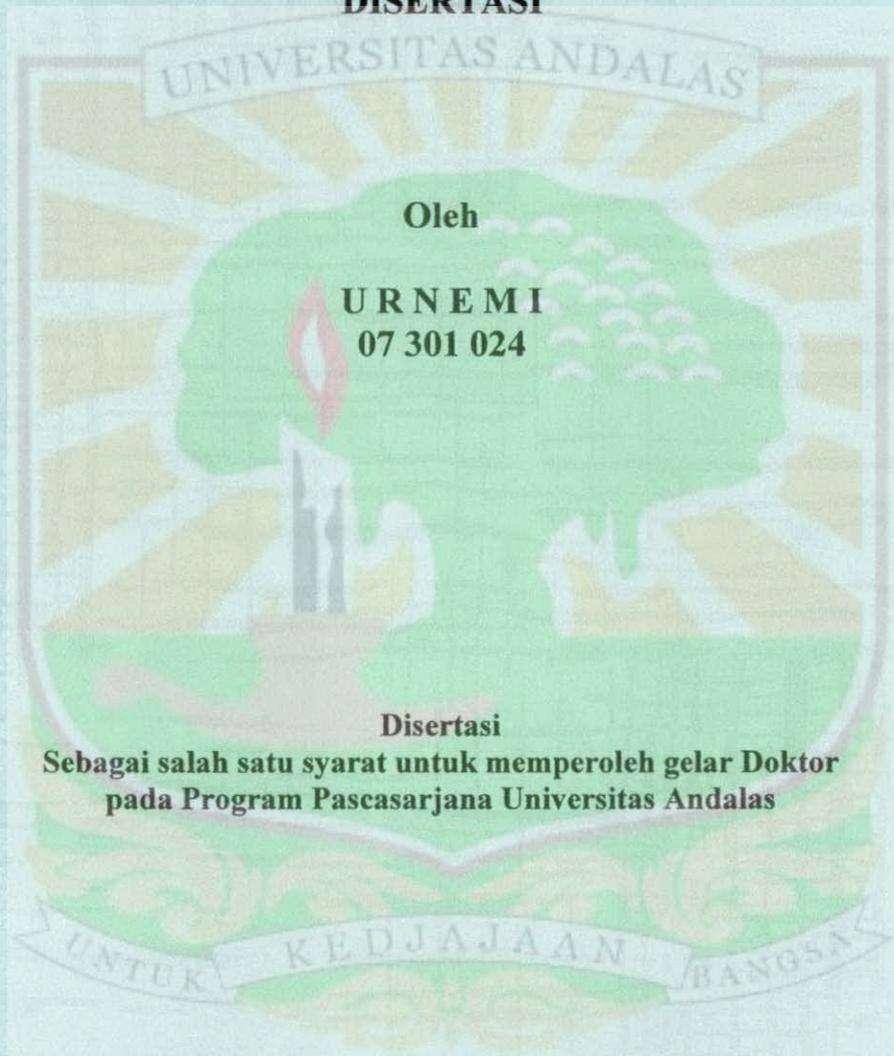
Molecular identification of five LAB potential (Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 and Hb3.3) by using 16S rRNA were done. The result showed that Gr2.3 isolate had similarity 99% with *Lactobacillus plantarum* subsp, Gr3.7 isolate had similarity 90%, Hb2.11 had similarity 99%, Hb3.3 had similarity 98% with *Pediococcus pentosaceus* of ATCC 25745, while R2.4 isolat had similarity 97% with *Pediococcus acidilactici* 7\_4 cont 1.26 and the highest candidate of probiotic potential explained above was *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 with isolat code was Hb3.3.

The second research, was conducted to study application of probiotic *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 to lower meat cholesterol and triglyceride content of egg came from Pitalah duck, while the result showed that giving 2 ml *Pediococcus pentosaceus* ATCC by oral can degradation of meat cholesterol rate of Pitalah duck from 39.2266, mg /dl (without giving probiotic as control), becoming 32.6566 mg /dl lower around 17 % compared to control. At giving 3 ml doses can degraded rate of trigliserida ( yellow + white) egg Pitalah duck from 258.01 mg /dl become 73.32 mg dl, go down 71.58 % triglyceride of control. Doses 2 ml probiotic effective to degradation of cholesterol meat and 3 ml doses was effective to egg trigliserida of Pitalah duck.



**ISOLASI, PENENTUAN ANTIMIKROBIAL DAN  
KARAKTERISASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT  
DARI FERMENTASI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* Lin)  
ASAL SUMATERA BARAT DAN APLIKASINYA UNTUK  
MENUNJANG KESEHATAN MASYARAKAT**

**DISERTASI**



Oleh

**URNEMI**  
**07 301 024**

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor  
pada Program Pascasarjana Universitas Andalas

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS PADANG  
2012**

## RIWAYAT HIDUP

**Urnemi**, dilahirkan pada Tanggal 27 Juli 1965, di Padang Panjang Sumatera Barat, sebagai anak ke enam dari enam bersaudara dari pasangan **Syuib Sutan Mudo dan Nurbaiti**. Sewaktu masuk sekolah, ada kesalahan administrasi pencatatan tanggal lahir, tanggal lahir penulis tercatat pada tanggal 14 Mei 1964 dan diikuti sampai sekarang.

Penulis menamatkan SD pada tahun 1977 di SD Negeri 14 Padang Panjang, kemudian melanjutkan ke Madrasah Tsanawiyah Muhammadiyah Kauman Padang Panjang, tamat tahun 1981. Penulis melanjutkan ke SMA Negri I Padang Panjang tamat tahun 1984. Selanjutnya pada tahun tersebut penulis diterima sebagai Mahasiswa Undangan jalur PMDK di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas. Pada bulan Juni 1989, penulis memperoleh gelar Sarjana Biologi dengan penelitian "**Respons Penambahan NAA dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan Eksplan Jeruk Kacang (*Citrus reticulata*) asal Sumatra Barat secara *In vitro***" di bawah bimbingan Ibu Dra. Hj. Netty WS, MS dan Ibu Dra. Hj. Zuraida Dawair M.Si.

Penulis menikah pada 26 Maret 1989 dengan Drs. **Edmon Hizbullatief, M.Si.**, dikaruniai satu orang putri **Aisyah Amatullah Al-Muwaffaqoh, S.Ked.** tiga orang putra **Muhammad 'Abdullah AM, Abdul Hamid Az-Zaky, M. Zahied 'Azmi**. Pada tahun 1993 penulis diterima sebagai Dosen di Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman Samarinda.

Pada tahun 1998 penulis diberi kesempatan melanjutkan studi ke jenjang S2 di Institut Pertanian Bogor (IPB) pada bidang ilmu Bioteknologi Kultur Jaringan dengan judul penelitian, "**Pengaruh Penambahan Tidiazuron (TDZ) dan *Agrobacterium rhizogenes* terhadap Inisiasi Akar Rambut dan Analisis Metabolit Sekundernya pada Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis*) asal Kalimantan Timur**". Ketika akan seminar hasil Dosen Pembimbing I (**Prof. DR. Livy Winata Gunawan M.Sc**), meninggal dunia, alhasil karena Pembimbing II memiliki latar belakang ilmu yang tidak sama, maka penulis mengulang penelitian dengan judul dan objek penelitian yang berbeda, yaitu "**Pengaruh Persentase Naungan dan Dosis Herbal Fertilizer terhadap**

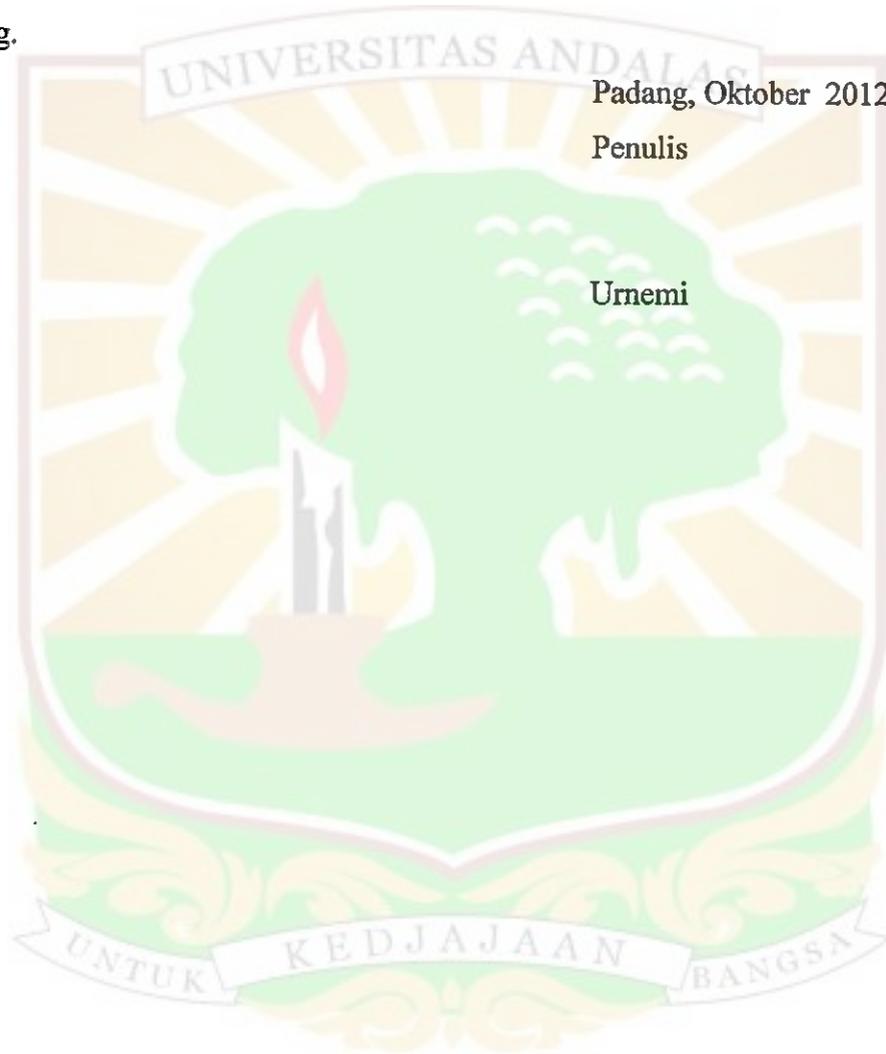
**Pertumbuhan Tanaman Daun Jinten (*Coleus amboinicus* Lour) serta Analisis Fitokimia Metabolit Sekunder yang dihasilkannya” Penulis tamat pada tahun 2002.**

Selanjutnya pada tahun 2006, penulis melanjutkan studi di Program Pascasarjana Sekolah Farmasi Institut Teknologi (ITB) Bandung, namun hanya sempat 1 tahun, penulis mengundurkan diri dan pada tahun 2007 penulis melanjutkan di Program Studi Ilmu Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Padang, Oktober 2012

Penulis

Urnemi



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, dengan mengucapkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, penulis telah dapat menyelesaikan disertasi ini yang berjudul **“Isolasi, penentuan antibakterial dan karakterisasi molekuler bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* Lin) asal Sumatra Barat dan aplikasinya untuk menunjang kesehatan masyarakat”**. Merupakan salah satu persyaratan dalam penyelesaian Program Doktor Pascasarjana Ilmu Kimia Universitas Andalas Padang.

Penulisan disertasi ini tidak terlepas dari dukungan dan dorongan dari berbagai pihak, baik moril maupun spiritual, untuk itu ucapan terima kasih dan penghargaan yang setulus-tulusnya penulis sampaikan kepada :

- Ibu Prof. DR. Sumaryati Syukur, M.Sc., Ph.D. selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan ilmu yang baru bagiku , memberikan motivasi, memberikan ide dan pengalaman yang sangat berharga, dengan sabar membimbing, agar aku mampu menguasai di bidang ilmu tersebut, awal dari penelitian sampai penyelesaian tulisan ini.
- Ibu Prof. DR. Drh. Hj. Endang Purwati RN, M.Si., Ph.D. selaku pembimbing II dan sebagai Ibundaku, penyemangat, mengobati dan menjaga kesehatanku ketika aku tidak kuat meneruskan penelitian ini, Beliau telah mentransfer berbagai ilmu, motivasi, inspirasi dan berbagai pengalaman serta mengarahkan mulai dari perencanaan penelitian, pelaksanaan sampai penyempurnaan penulisan ini.
- Bapak Prof. DR. Sanusi Ibrahim, M.Sc., selaku pembimbing III dan Dosen Kimia Analisis, pemberi saran nasehat serta bimbingan ilmu yang sangat berharga bagi penulisan ini.

- Bapak Prof. DR. Sc. Agr., Ir. Jamsari, MP., selaku pembimbing IV yang membantu dan memberikan fasilitas laboratorium, serta pembimbing konsultasi ilmu molekuler dari peneltaian ini, mulai penelitian sampai penulisan disertasi ini.
- Bapak Prof. Syafruddin Karimi, SE, MA. PhD., sebagai Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas yang baru, Beliau telah memberikan berbagai fasilitas, kemudahan, sarana dan pra sarana sampai penyelesaian program Doktor ini.
- Bapak Prof. DR. Yunazar Manjang, sebagai Ketua Jurusan Kimia Program Pascasarjana Universitas Andalas, sebagai Bapanda saya tempat mengadu dalam segala proses pengurusan ujian dan sampai akhir penulisan ini.
- Bapak Prof. DR. Abdi Darma M.Sc., Bapak DR. Maiefdi, M.Sc, Bapak DR. Afrizal, M.Sc. sebagai Dosen dan Penguji saya di ujian doktor ini.
- Prof. Yong-ung Kim, PhD. di Daegu Haany University, Gyeongsangbuk-do, Korea Selatan dan DR. Enos Tangke Arung, M.Sc di Laboratorium Analysis Chemistry of Plant Forestry East Kalimantan, dengan tulus telah membantu publikasi dan usul Paten penelitian disertasi ini.
- Bapak A. Zainal Mustopa, M.Si, Kepala Laboratorium Bioteknologi Virologi LIPI, Bakosurtanal Cibinong Bogor. Telah membimbing dengan sabar, memberikan ilmu, motivasi, mulai penelitian sampai saya temukan satu produk dalam disertasi ini. Teman-teman di Lab, Mas Ridwan, Mbak Linda, Skotia, Tia, Ike, Ika, Putze', Vian, Soleh, Dewi, Maya, Reni, Iik, Rida, Bowo, Fatur, Ayu, Mäs Koëkoëñ, mërëka teman diskusi saya, dengan tulus berbagi ilmu,

telah setia menemani saya dalam penelitain sampai berakhir penelitian saya disana.

- Bapak DR. Yuhermen, M.Si, PhD. Kepala Lab. Mikrobiologi di Fakultas Peternakan Universitas Andalas, telah memfasilitasi penelitian saya, dan tempat saya konsultasi.
- Teman-teman di Pascasarjana Universitas Andalas, DR. M. Sitorus, M.Si, DR. Ir. Husmaini, M.Si, Hendri Purwanto, SPt., MSi, Sarah, Naldi, Nancy, Fira, Rina, Ela, Pak Wahud, dan lain-lain.
- Semua teman-temanku yang tidak kutuliskan namanya dan tidak dapat diungkapkan dengan kata-kata atas bantuan, dukungan, hiburan sampai selesainya penulisan ini.

Penulis mengharapkan adanya kritik dan saran demi perbaikan dan kesempurnaan di masa yang akan datang. Akhirnya penulis persembahkan tulisan ini semoga memberi manfaat bagi pengembangan ilmu dan memberikan kontribusi bagi masyarakat.

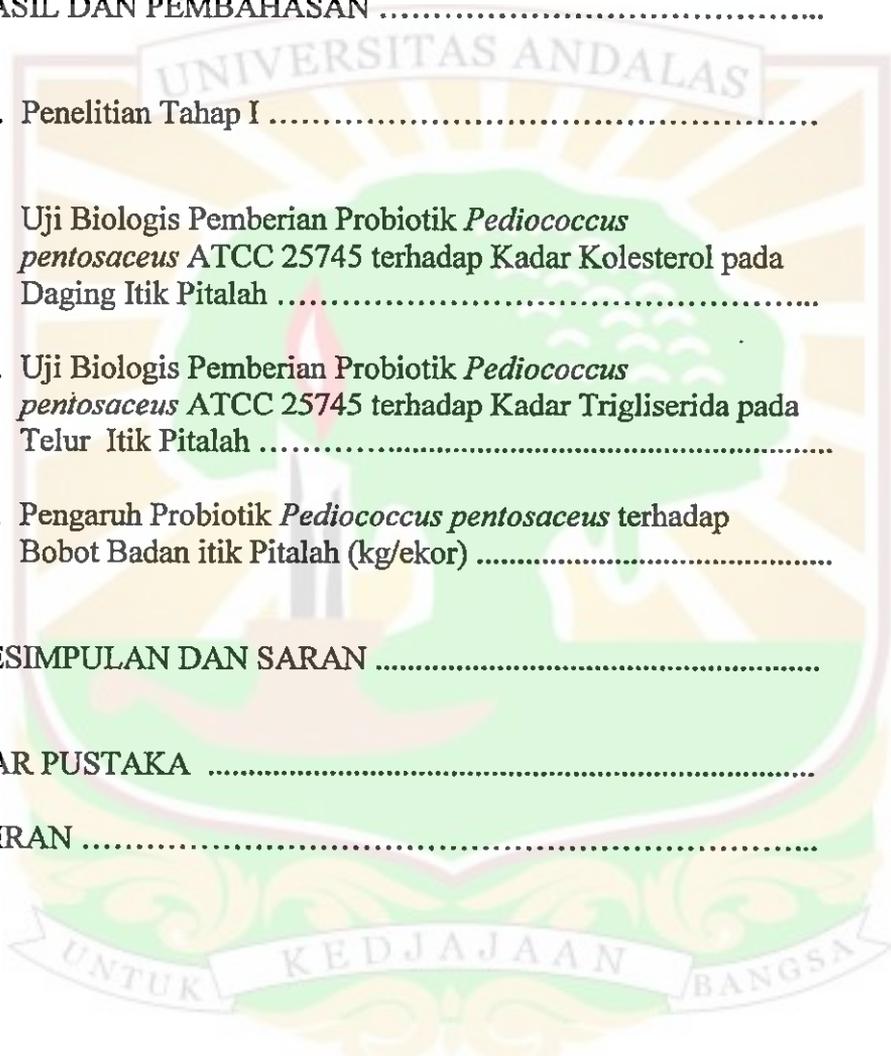
Padang, Oktober 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	6
1.3. Tujuan Penelitian .....	7
1.4. Manfaat Penelitian .....	7
1.5. Hipotesis Penelitian .....	8
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	9
2.1. Bakteri Asam Laktat .....	9
2.2. Probiotik .....	12
2.3. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat terhadap Penurunan Kolesterol dan Triglicerida .....	15
2.4. Bakteriosin .....	21
2.5. <i>Pediococcus sp.</i> .....	28
2.6. Review Penelitian Probiotik BAL dan <i>Pediococcus sp.</i> .....	29

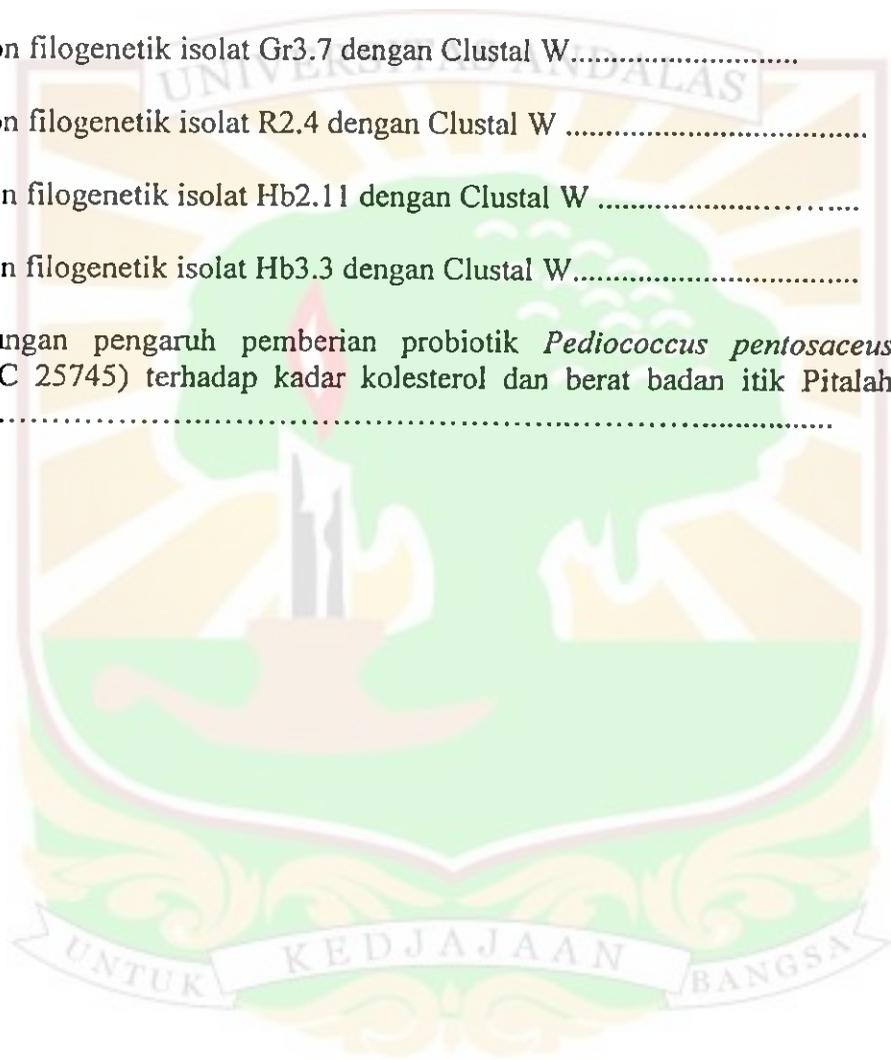
III. METODA PENELITIAN .....	33
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	33
3.2. Penelitian Tahap Pertama .....	33
3.3. Penelitian Tahap Dua .....	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	52
4.1. Penelitian Tahap I .....	52
4.2. Uji Biologis Pemberian Probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 terhadap Kadar Kolesterol pada Daging Itik Pitalah .....	90
4.3. Uji Biologis Pemberian Probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 terhadap Kadar Trigliserida pada Telur Itik Pitalah .....	95
4.4. Pengaruh Probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> terhadap Bobot Badan itik Pitalah (kg/ekor) .....	98
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	103
DAFTAR PUSTAKA .....	104
LAMPIRAN .....	119



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Teks	Halaman
1.	Bakteri asam laktat berbentuk batang dan kokus (bulat) .....	9
2.	Mekanisme pertumbuhan bakteri asam laktat yang menghasilkan berbagai macam produk metabolit untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen .....	14
3.	Peranan BAL membentuk asam empedu dekonjugasi .....	17
4.	Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen .....	24
5.	Bagan penelitian uji biologis probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> terhadap kadar kolesterol daging dan kadar trigliserida telur itik Pitalah .....	49
6.	Foto koloni dan pemurnian Bakteri asam laktat .....	53
7.	Pewarnaan gram positif dari BAL, BAL berbentuk batang (A), BAL bentuk kokus (B) .....	55
8.	Zona hambat 5 isolat BAL potensial terhadap bakteri patogen .....	59
9.	Kultivasi isolat Hb3.3 pada berbagai pH pada media MRS Broth .....	62
10.	Aktifitas antimikrobal (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap <i>Escherichia coli</i> 48 jam pengamatan .....	65
11.	Aktifitas antimikrobal (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap <i>Salmonella typhi</i> 48 jam pengamatan .....	66
12.	Aktifitas antimikrobal (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap <i>Bacillus subtilis</i> 48 jam pengamatan .....	67
13.	Aktifitas antimikrobal (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap <i>Listeria monocytogenes</i> 48 jam pengamatan .....	67
14.	Kurva OD (Optikal Densiti) bakteri asam laktat Hb3.3 selama 28 jam .....	72

15. Aktifitas antimikrobiai dari bakteriosin yang dihasilkan isolat Hb3.3 dengan beberapa presipitasi ammonium sulfat terhadap <i>listeria monocytogenes</i> .....	73
16. Bobot molekul bakteriosin isolat Hb3.3 dengan menggunakan SDS PAGE .....	76
17. Hasil uji PCR lima isolat Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3 .....	80
18. Pohon filogenetik isolat Gr2.3 dengan Clustal W .....	83
19. Pohon filogenetik isolat Gr3.7 dengan Clustal W.....	84
20. Pohon filogenetik isolat R2.4 dengan Clustal W .....	85
21. Pohon filogenetik isolat Hb2.11 dengan Clustal W .....	88
22. Pohon filogenetik isolat Hb3.3 dengan Clustal W.....	89
23. Hubungan pengaruh pemberian probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745) terhadap kadar kolesterol dan berat badan itik Pitalah .....	101



## DAFTAR TABEL

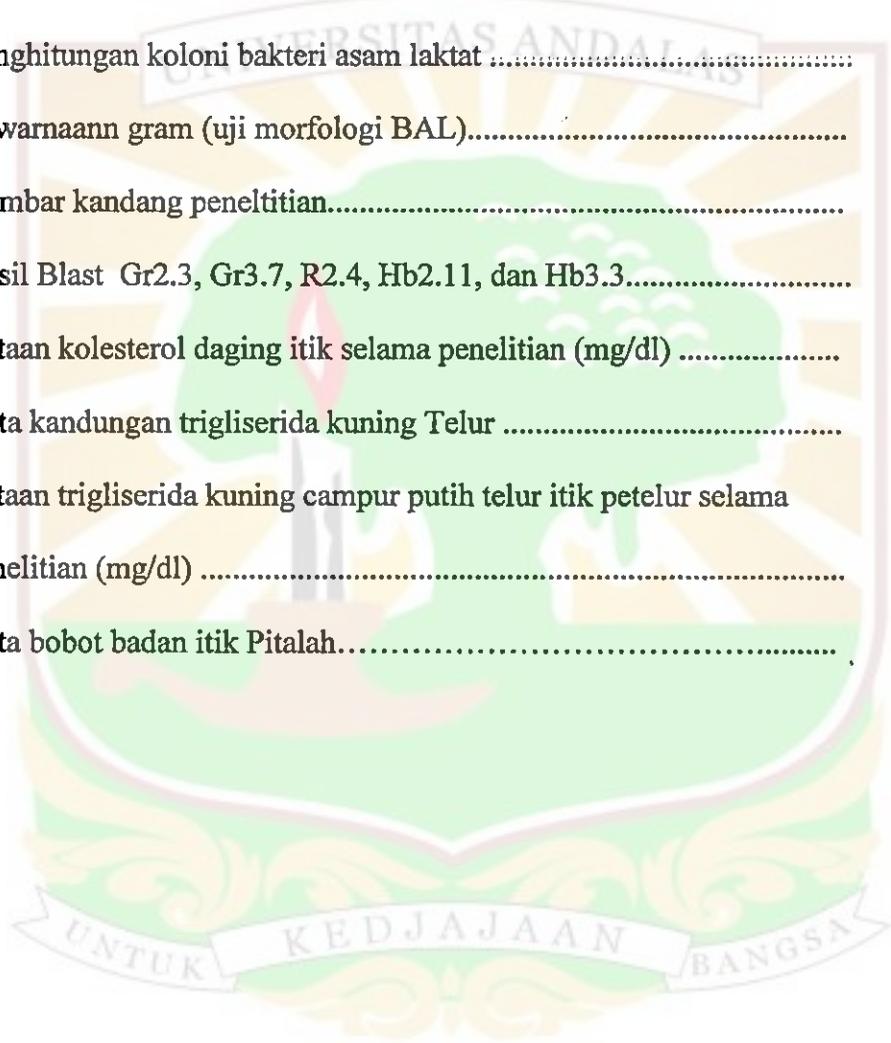
Tabel	Teks	Halaman
1.	Isolasi spesies <i>pediococcus pentosaceus</i> Karakterisasi dan Purifikasi Bakteriosin dari Berbagai Produk Fermentasi .....	30
2.	Komposisi ransum ternak .....	47
3.	Kode 66 isolat BAL asal biji kakao varietas <i>Criollo</i> , <i>Forestero</i> dan <i>Trinitario</i> pada 2 dan 3 hari Fermentasi .....	53
4.	Karakteristik morfologi koloni, sel dan pengujian gram .....	54
5.	Aktifitas antimikroba 5 isolat BAL terhadap bakteri patogen .....	57
6.	Kultivasi isolat Hb3.3 berbagai pH pada media MRS Broth (Merck).....	62
7.	Aktifitas antimikroba isolat BAL probiotik (Hb3.3) yang dikultivasi pada berbagai pH .....	63
8.	Aktifitas antimikroba Isolat Hb3.3 pada berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan pada pengamatan ke-48 jam .....	66
9.	Tingkat kekeruhan (Optikal densiti) BAL probiotik (Hb3.3) .....	72
10.	Hasil analisis BLAST sekuen DNA pada lima isolat BAL .....	81
11.	Hasil analisis sekuen isolat Gr2.3 dengan menggunakan BLAST .....	82
12.	Hasil analisis sekuen isolat Gr3.7 dengan menggunakan BLAST .....	84
13.	Hasil analisis sekuen isolat R2.4 dengan menggunakan BLAST .....	85
14.	Hasil analisis sekuen isolat Hb2.11 dengan menggunakan BLAST .....	87
15.	Hasil analisis sekuen isolat Hb3.3 dengan menggunakan BLAST .....	89
16.	Total koloni, morfologi dan pewarnaan gram isolat <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 yang telah dibiakkan .....	91
17.	Rata-rata kandungan kolesterol daging itik Pitalah setelah pemberian inokulum probiotik <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 pada berbagai dosis .....	92

18. Kadar rata-rata kandungan trigliserida telur itik Pitalah pada perlakuan pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 berbagai dosis ..... 95
19. Rata-rata bobot badan itik Pitalah setelah pemberian inokulum probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada berbagai Dosis ..... 99



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Teks	Halaman
1.	Diagram alir penelitian .....	119
2.	Isolasi koloni BAL, <i>Serial Delution</i> dan penghitungan jumlah koloni .....	122
3.	Penghitungan koloni bakteri asam laktat .....	123
4.	Pewarnaann gram (uji morfologi BAL).....	124
5.	Gambar kandang peneltitan.....	125
6.	Hasil Blast Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11, dan Hb3.3.....	126
7.	Rataan kolesterol daging itik selama penelitian (mg/dl) .....	133
8.	Data kandungan trigliserida kuning Telur .....	137
9.	Rataan trigliserida kuning campur putih telur itik petelur selama penelitian (mg/dl) .....	141
10.	Data bobot badan itik Pitalah.....	144



## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Bakteri Asam Laktat (BAL) akhir-akhir ini menjadi pokok bahasan di bidang sains, kesehatan dan industri karena banyak manfaatnya untuk menjaga kesehatan. Marteau (2002) menjelaskan, BAL merupakan jenis mikroorganisme yang aman (*food grade microorganism*) yang dikategorikan sebagai mikroba yang baik atau aman untuk kesehatan (*Generally Recognized As Safe*) atau (GRAS). Menurut FAO/WHO (2002), BAL dalam usus akan memberikan keuntungan bagi inangnya, minimum dalam jumlah  $10^8$  CFU/g. Fuller (2002) dan Widodo (2003) menjelaskan, BAL dapat berfungsi sebagai anti diare, meningkatkan metabolisme tubuh, menurunkan kolesterol dan meningkatkan daya tahan tubuh dan mencegah terjadinya kanker usus. Sebelumnya O'sullivan *et al.* (2002) menyatakan, BAL dapat menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin, yaitu senyawa protein sederhana yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif penyebab penyakit seperti *E. coli*, *Listeria*, *Salmonella* dll. Stanton *et al.* (2001) menyatakan, BAL menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti asam laktat,  $H_2O_2$ ,  $CO_2$ , disamping itu juga mampu menguraikan senyawa karbohidrat, protein dan lemak kompleks menjadi senyawa sederhana seperti, glukosa, fruktosa, asam amino dan asam lemak rantai pendek.

Penggunaan BAL sebagai probiotik dan bakteriosin sebagai antibiotik alami, adalah suatu upaya untuk mengurangi penggunaan antibiotik sintesis dan efek negatif dari konsumsi antibiotik terus menerus. Penggunaan antibiotik terus menerus akan mengakibatkan resistensi mikroba terhadap antibiotik, dan mikroba resistan antibiotik sangat berbahaya untuk lingkungan. Selain itu pada hewan

ternak seperti pada unggas akan meninggalkan residu pada daging/karkas. Surono (2004) menyatakan, bakteriosin yang potensial adalah bakteriosin yang memiliki kemampuan yang tinggi menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Listeria monocytogen*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypii* dan *Bakteri subtilis*, selain itu bakteriosin yang dihasilkan stabil pada suhu tinggi (tahan terhadap pemanasan diatas 100° C selama 30 menit dan 121° C selama 15 menit). Bakteriosin yang stabil pada suhu tinggi dan sensitif terhadap salah satu bakteri patogen yaitu *Listeria* digolongkan kepada bakteriosin tipe II (Lanthionin), yang memiliki bobot peptida sekitar  $\leq 10$  kDa. Ditambahkan oleh Syukur, Urnemi, Purwati, Jamsari dan Fajrul (2011) bahwa bakteriosin bersifat antimikroba potent yang struktur kimianya merupakan senyawa protein sederhana (peptida) yang bersifat sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen dan tidak berbahaya untuk manusia dan hewan. Penelitian tentang pemurnian bakteriosin dan penentuan berat molekul dan struktur kimianya, telah membuka potensi penggunaan antibiotik alami sebagai pengganti antibiotik sintesis.

Pada saluran pencernaan, BAL dapat menurunkan kadar kolesterol, karena BAL menghasilkan enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Enzim BSH adalah enzim yang mampu mendekongugasi asam empedu sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekonjugasi, kemudian akan disekresi melalui feses, sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol pada darah atau pada daging. Brady, Gallaher dan Busta (2000), Pereira, McCartney dan Gibson (2003), Pato (2003), Purwati (2006), Liong (2008), Astuti dan Ana (2010) dan Lee, Kim, Yun dan Oh (2010) menyatakan bahwa, BAL berfungsi pada pencegahan kanker kolon dan usus. Sebelumnya Salminen, Wright dan Ouwehand (2007), Betsi, Papadavid dan

Falagas (2008), Torii, Itoh, Urisu dan Terada (2010) menambahkan, BAL berfungsi juga dalam penanggulangan dermatitis atopik pada anak-anak. BAL dapat membantu untuk absorpsi nutrisi, mengurangi tekanan darah tinggi, membantu pencernaan laktosa bagi penderita *lactose intolerance*. Sebelumnya Salazar, Quintanilla, Caciano dan Valiente (2007), Pant, Marcotte, Brüssow, Svensson dan Hammarström (2007), Tabbers dan Benninga (2007), Collado, Isolauri dan Salminen (2008) menjelaskan, BAL juga berfungsi dalam penanggulangan diare, menstimulasi sistem kekebalan (*immune*) tubuh.

Pemanfaatan BAL sebagai probiotik pada hewan ternak khususnya pada unggas telah dilakukan oleh peneliti terdahulu, diantaranya Mayahi (2002) telah berhasil meneliti pengaruh BAL dari *Enterococcus faecium* dan *Bifidobacterium* dapat menurunkan kolesterol dan trigliserida pada ayam broiler. Setelah itu Mansoub (2010) berhasil meneliti, yaitu pemberian BAL spesies *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei* sebanyak 0.5% berpengaruh terhadap penurunan kadar kolesterol dan trigliserida darah ayam broiler. Selanjutnya Purwati (2011) meneliti pemberian 3 ml ( $3.9 \times 10^8$  CFU/g) *Lactococcus plantarum* asal blondo yang disertakan dalam ransum, dapat menurunkan kolesterol daging dan telur ayam rendah kolesterol.

Menurut Okade (2003) dalam Husmaini (2012), BAL dapat diisolasi dari tanaman dan saluran pencernaan hewan atau produk yang berasal dari hewan, seperti susu fermentasi, akan tetapi karakteristik BAL yang berasal dari tanaman berbeda dengan BAL yang berasal dari susu, hal ini disebabkan pada tanaman banyak terdapat senyawa metabolit sekunder bioflavonoid yang dapat bersifat antioksidan.

Kemampuan dari masing-masing BAL dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat juga berbeda, meskipun memiliki strain yang sama, seperti *Lactobacillus delburuckii ssp. bulgaris* asal susu tidak bisa tumbuh pada tanaman karena tidak dapat memanfaatkan maltose, sedangkan *Lactobacillus delburuckii ssp. bulgaris* yang berasal dari sari buah tidak bisa ditumbuhkan pada susu karena tidak bisa memfermentasi laktosa. Sebelumnya Sahlin (1999), Pato (2003) dan setelah itu Nur (2005) menyatakan, pada tahun 1980-an penelitian BAL masih difokuskan kepada pangan fermentasi. Selanjutnya Ooi, Lay-Gaik dan Min-Tze Liong (2010), Syukur, Urnemi, Purwati, Jamsari dan Fajrul (2011) dan Purwati (2011) menyatakan bahwa, pada tahun 2000-an penelitian BAL lebih fokus kepada peranan BAL sebagai probiotik dan pengawet makanan, sedangkan akhir-akhir ini BAL yang potensial dengan karakterisasi mikrobiologi, biokimia dan DNA molekular adalah sangat bermanfaat untuk menjaga kesehatan total, meningkatkan daya tahan tubuh, menurunkan kolesterol dan meningkatkan metabolisme tubuh.

Untuk mendapatkan BAL yang potensial perlu dilakukan isolasi dan skrining BAL, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi DNA molekular, purifikasi dan uji bakteriosin, hingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik untuk menjaga kesehatan total. BAL potensial, yang telah terkarakterisasi dan teridentifikasi baik konvensional maupun molekular yang dipatenkan memiliki nilai yang tinggi untuk diaplikasikan yaitu di bidang kesehatan, keamanan pangan *food safety* dan di bidang peternakan sebagai probiotik/*supplement* (Yunenshi, Syukur, dan Purwati, 2011). Sebelumnya Axelson (2004) menyatakan, BAL terdiri dari 4 genus yaitu *Lactobacillus*,

*Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Sterptococcus*. Seiring berkembangnya kemajuan ilmu DNA molekular, BAL berkembang menjadi 20 genus yang berbeda.

Fermentasi biji kakao menggunakan pulpa (selaput lendir yang menyelimuti biji kakao) yang mempunyai kadar karbohidrat glukosa, fruktosa dan sukrosa yang cukup tinggi, sehingga pada proses fermentasi akan terurai menjadi asam laktat dan dapat menurunkan pH. Biji kakao yang difermentasi pada hari pertama memiliki pH 5, pada hari ke-2 dan ke-3 pH turun menjadi 2 dan 3. Ardhana dan Fleet (2003) menjelaskan spesies BAL yang dapat tumbuh pada setiap varietas kakao, tergantung pada kadar asam laktat yang terbentuk yang berasal dari fermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa. Selanjutnya Mahdavi, Rahmani dan Pourreza (2005) menambahkan, senyawa protein pada biji kakao akan diuraikan menjadi senyawa aroma (ester, aldehyd dan keton), sedangkan lemak diuraikan dari lemak rantai panjang (*long chain fatty acid*) menjadi lemak dengan rantai sederhana (*short chain fatty acid*) seperti laurat, kaprat dan kaprilat.

Sumatera Barat berpotensi sebagai sentra produksi kakao di wilayah barat Indonesia. Tiap tahun produksi biji kakao mentah selalu bertambah dan pada tahun 2011 produksi kakao Sumatera Barat mencapai 34.806 ton. Ada tiga varietas kakao yang dibudidayakan yaitu varietas *Criollo*, *Forestero* dan *Trinitario* (Statistik Perkebunan Indonesia dan Departemen Pertanian, 2011). Ketiga varietas kakao tersebut memiliki kandungan glukosa, fruktosa dan sukrosa pada pulpa yang berbeda. Sebelumnya hasil penelitian Ardhana dan Fleet (2003), kakao varietas *Trinitario* memiliki kandungan glukosa, fruktosa dan sukrosa yaitu, 24 mg/g, 42 mg/g dan 21 mg/g, sedangkan varietas *Forestero* yaitu 41 mg/g, 62 mg/g, dan 32 mg/g. Hal inilah yang menjadi menarik untuk diteliti, untuk

mendapatkan BAL baru sebagai probiotik jika dilakukan isolasi, penentuan antimikrobal bakteriosin, karakterisasi berat molekul bakteriosin dan karakterisasi molekular bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* Lin) asal Sumatera Barat tersebut.

Pada ungkapan diatas, bahwa BAL dari fermentasi kakao sebagai probiotik yang dapat menurunkan kolesterol dapat diaplikasikan pada peternakan unggas, seperti halnya produk unggas yang banyak dikonsumsi manusia baik dari daging dan telur. Dalam peternakan unggas Sumatera Barat mempunyai ternak lokal seperti ternak itik pitalah. Keputusan Menteri Pertanian (2011) menetapkan di bidang peternakan Sumatera Barat memiliki satu spesies itik lokal yang telah dikenal oleh masyarakat secara turun temurun. Itik tersebut dinamakan “Itik Pitalah”, yang merupakan komoditas unggulan di peternakan unggas.

Berdasarkan uraian diatas, penulis melakukan penelitian tentang **isolasi, penentuan aktivitas antimikrobal, karakterisasi molekular, berat molekul bakteriosin, identifikasi bakteri asam laktat dengan menggunakan 16S rRNA dari fermentasi biji kakao asal Sumatera Barat dan aplikasinya untuk menunjang kesehatan masyarakat.**

## **1.2. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Apakah BAL yang berpotensi probiotik, tahan pH asam dapat diisolasi dari proses fermentasi biji kakao yang berasal dari Sumatera Barat ?
2. Bagaimana potensi isolat-isolat BAL tersebut sebagai antimikroba patogen.
3. Apakah spesies BAL tersebut dapat diidentifikasi secara DNA molekular dengan menggunakan 16S rRNA ?

4. Dapatkah BAL tersebut diaplikasikan untuk menurunkan kadar kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah.

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Melakukan isolasi BAL, skrining dan penentuan aktifitas antimikroba pada fermentasi biji kakao Sumatera Barat.
2. Mempelajari karakterisasi BAL yang potensial sebagai antimikroba dari 3 varietas kakao Sumatera Barat
3. Melakukan identifikasi molekuler dengan 16S rRNA terhadap beberapa isolat BAL yang potensial.
4. Meneliti pengaruh pemberian BAL temuan baru sebagai kandidat probiotik terhadap penurunan kadar kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan bermanfaat :

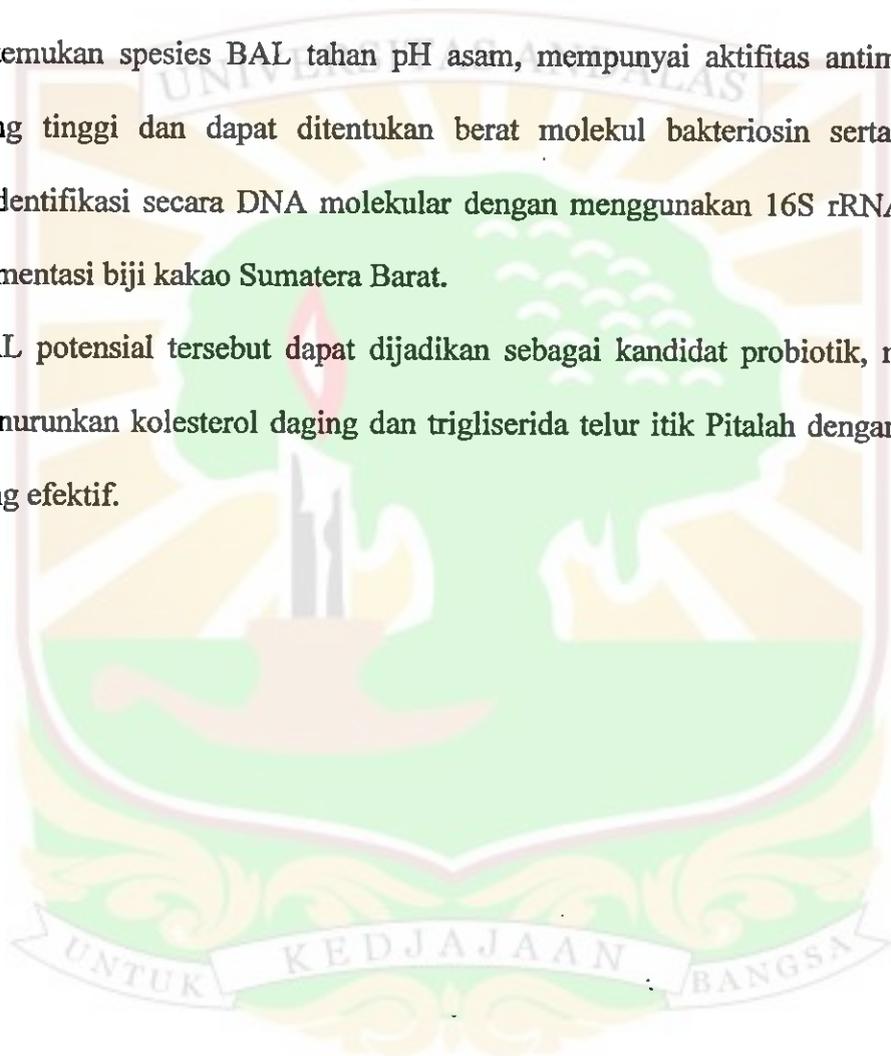
1. Dapat memberikan informasi kepada petani kakao, tentang pentingnya melakukan fermentasi biji kakao, karena adanya mikroba BAL dapat membunuh mikroba patogen dan dapat meningkatkan kualitas (aroma, citarasa dan warna) biji kakao, dan dapat disimpan lama sehingga dapat meningkatkan pendapatan petani dan industri produk coklat.
2. Sebagai sumber informasi ilmiah ditemukan spesies BAL yang berpotensi sebagai kandidat probiotik untuk menjaga kesehatan dan mempunyai karakterisasi pH, suhu , Optikal Densiti (OD), penentuan berat molekul dan identifikasi molekuler dengan menggunakan 16S rRNA.

3. Dapat memberikan informasi bahwa, probiotik BAL terpilih dapat diaplikasikan untuk menurunkan kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah.

### 1.5. Hipotesis

Pada penelitian ini ada beberapa hipotesa sebagai berikut :

1. Ditemukan spesies BAL tahan pH asam, mempunyai aktifitas antimikroba yang tinggi dan dapat ditentukan berat molekul bakteriosin serta dapat diidentifikasi secara DNA molekular dengan menggunakan 16S rRNA pada fermentasi biji kakao Sumatera Barat.
2. BAL potensial tersebut dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik, mampu menurunkan kolesterol daging dan trigliserida telur itik Pitalah dengan dosis yang efektif.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif, gram positif, berbentuk batang atau bulat (Gambar 1), tidak membentuk spora dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa dan sukrosa) (Salminen, 2007). Efek antimikrobia dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat. Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6 - 8 (Taylor, 2004).

BAL merupakan jenis mikroorganisme yang aman *food grade microorganism* dalam kategori *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Surono, 2004). Menurut FAO/WHO (2002) BAL dalam usus akan memberikan keuntungan bagi inangnya, yaitu sedikitnya  $10^8$  CFU/g. Menurut Axelson (2004) BAL terdiri dari 4 genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Sterptococcus*. Seiring berkembangnya kemajuan molekular, BAL berkembang menjadi 20 genus.



Gambar 1. Bakteri asam laktat berbentuk batang (A) atau kokus (B) (Sumber : Salminen, Wright dan Ouwehand (2007))

Madigan dan Martinko (2006) menyatakan BAL dapat dibagi menjadi dua kategori berdasarkan jalur metabolisme karbohidratnya, yaitu homofermenter dan

heterofermenter. Jalur produksi asam laktat untuk kedua kelompok probiotik tersebut berbeda. Homofermenter menghasilkan asam laktat umumnya melalui glikolisis oleh bakteri *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* dan *Betabacteri* yang merupakan bakteri gram positif. Selanjutnya Priscilla dan Sanchez (2009) menjelaskan bahwa, yang termasuk heterofermenter adalah bakteri *Lactobacillus brevis* dan *Leuconostoc mesenteroides*. Sebelumnya Surono (2004) menyatakan bahwa pada BAL heterofermenter, penguraian glukosa dilakukan melalui jalur pentosa fosfat. Pada fermentasi ini yang bekerja adalah *fosfoketolase* dan dapat menghasilkan asam laktat 40%-50%, etanol, asam asetat dan CO<sub>2</sub>.

Saarela, Monogensen, Fonden, Matto dan Sandholm (2000) menyatakan BAL dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti asam laktat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>. Selanjutnya Stanton *et al.* (2001) menyatakan, BAL yang potensial mampu menguraikan senyawa rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak. Fleet (2003) menyatakan pada proses fermentasi BAL dapat menguraikan sukrosa, fruktosa dan glukosa yang terdapat pada media tumbuhnya menjadi asam laktat. Jenis asam laktat yang dihasilkan tergantung pada spesies BAL, lingkungan (pH dan suhu), komposisi kultur (kadar glukosa, fruktosa dan sukrosa). Asam laktat dapat menurunkan pH saluran pencernaan, membunuh bakteri patogen, menstimulir sekresi asam lambung, meningkatkan pristaltik lambung dan berfungsi sebagai energi pada proses respirasi, kemudian protein pada media akan diuraikan menjadi senyawa aroma (ester, aldehid dan keton). Nur (2005) menyatakan, lemak yang terdapat pada usus/sistim pencernaan diuraikan dari lemak rantai panjang (*long chain fatty acid*) menjadi lemak dengan rantai sederhana (*short chain fatty acid*).

Di bidang industri pangan saat ini BAL digunakan untuk pengawetan, memperbaiki tekstur dan cita rasa bahan pangan (Surono, 2004). BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida dan bakteriosin, dengan terbentuknya zat antibakteri dan asam, pada proses fermentasi asam laktat maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella* dan lainnya akan dihambat. Efektifitas BAL dalam menghambat bakteri pembusuk dipengaruhi oleh kepadatan BAL, strain BAL, dan komposisi media asal fermentasi (Afrianto, Liviawaty dan Rostini, 2006). Selain itu Rostini (2007) menyatakan produksi substansi penghambat dari BAL dipengaruhi oleh media pertumbuhan, pH dan temperatur lingkungan.

Isolasi dan uji identifikasi BAL pada produk fermentasi telah banyak dipublikasi, seperti ditemukan BAL dengan spesies *Pediococcus pentosaceus* yang memiliki antimikrobal yang kuat terhadap bakteri patogen yang berasal dari ASI manusia (Osmanagaoglu, Kiran dan Ingolf, 2001). *Pediococcus pentosaceus* ditemukan dari bekasam ikan (Yin dan Jiang, 2001). *Lactobacillus sp.* ditemukan dari fermentasi sayuran wortel, memiliki aktivitas antimikrobal terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereas* (Joshi, Sharma dan Rana, 2006). Selanjutnya Nengah, Ramona, Widarini, Suarini, Dwipayanti, Nocianitri dan Nursini (2008) menemukan *Lactobacillus* dan *Weisella* dari fermentasi susu kuda. Ernawati (2010) menemukan *Lactobacillus plantarum* pada susu kambing segar. Setelah itu ditemukan *Lactobacillus plantarum* pada blonde asal dari ampas *Virgin Coconut Oil* (VCO) oleh (Purwati, 2011). Syukur dkk. (2011) menemukan *Lactobacillus plantarum* dari fermentasi kakao green

asal Sumatra Barat. Sebelumnya Nur (2005) menyatakan, dari hasil isolasi dan identifikasi beberapa spesies BAL dari produk fermentasi yang berbeda ditemukan BAL berbeda yang mendominasinya, walaupun ditemukan spesies yang sama pada produk fermentasi yang berbeda akan tetapi aktifitas terhadap antimikrobiahnya akan berbeda.

## **2.2. Probiotik**

Probiotik merupakan salah satu alternatif antibiotik yang dapat berperan sebagai pemacu pertumbuhan. Probiotik secara umum didefinisikan sebagai kultur tunggal atau campuran yang menguntungkan bagi kesehatan manusia dan hewan. Bakteri secara sederhana dapat dikelompokkan menjadi bakteri "baik dan bakteri jahat". Bakteri asam laktat termasuk bakteri baik karena hanya membunuh /menghambat pertumbuhan bakteri jahat tidak untuk bakteri baik, oleh karena itu bakteri asam laktat disebut dengan probiotik. Bakteri patogen adalah bakteri yang menyebabkan banyak penyakit seperti diare, tifus, tetanus, TBC, bahkan antraks, apabila di lingkungan tersebut bakteri patogen lebih dominan, maka terjadilah penyakit (Haryanto, 2005).

Probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplementasi makanan. Pemberian probiotik dapat berpengaruh menguntungkan bagi kesehatan dimana probiotik menghasilkan senyawa-senyawa inhibitor seperti asam laktat dan 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

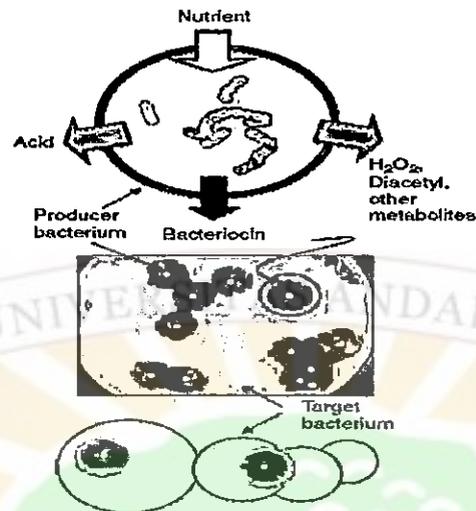
sebagai probiotik terutama dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Haryanto, 2004); Purwati dan Syukur, 2005).

BAL pada saluran pencernaan dapat menurunkan kadar kolesterol, karena BAL menghasilkan enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH). Enzim BSH adalah enzim yang mampu mendekongugasi asam empedu sehingga menghasilkan garam empedu bebas atau terdekongugasi, kemudian akan disekresi melalui feses, sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol pada darah atau pada daging (Purwati (2011), Astuti dan Ana (2010) dan Lee, Kim, Yun, Kim (2010), sebelumnya Brady, Gallaher dan Busta (2000), Pato (2003) dan Liong (2008) menjelaskan BAL dapat pencegahan kanker kolon dan usus. Betsi, Papadavid dan Falagas, (2008), Torii, Itoh, Urisu, Terada, dan Fujisawa (2010) menyatakan, BAL dapat membantu penanggulangan dermatitis atopik pada anak-anak. Sebelumnya Salminen *et al.* (2007) menyatakan, BAL membantu untuk absorpsi nutrisi, mengurangi tekanan darah tinggi, membantu pencernaan laktosa bagi penderita *lactose intolerance*. Selanjutnya Salazar *et al.* (2007), Pant *et al.* (2007), Tabbers dan Benninga (2007) menyatakan, BAL juga sebagai penanggulangan diare. Selanjutnya Isolauri dan Salminen (2008) menambahkan, BAL dapat menstimulasi sistem kekebalan (*immune*) tubuh.

Menurut Purwati dan Syukur (2005), tidak semua bakteri baik dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik. Kriteria probiotik 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 menyebabkan kematian pada bakteri lain (Gambar 2).



Gambar 2. Mekanisme pertumbuhan bakteri asam laktat yang menghasilkan berbagai macam produk metabolit untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Lucy, Deegan, Paul, Cotter, Colin dan Paul, 2005)

2. **Resisten terhadap seleksi sistem saluran pencernaan**, seperti asam lambung, cairan empedu, dan getah pankreas. Apabila 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 BAL 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 potensinya sebagai probiotik dan tidak cepat terbuang 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.

Menurut Suskovic, Kos, Goreta dan Matosic (2011), mekanisme kerja probiotik dapat diekspresikan menjadi 3 cara yaitu;

1. Menekan mikroorganisme patogen pada saluran pencernaan melalui produksi substansi antimikroba (asam laktat, asam asetat, asetaldehida, hidrogen peroksida dan bakteriosin), persaingan reseptor pada epitelium usus.
2. Merubah metabolisme mikrobial dengan meningkatkan aktifitas enzim yang bermanfaat seperti galaktosidase atau menekan enzim yang tak bermanfaat seperti glukuronidase, glukosidase, nitroreduktase.
3. Merangsang pembentukan kekebalan tubuh.

### **2.3. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat terhadap Penurunan Kolesterol dan Trigliserida**

Kolesterol merupakan bagian lemak yang cenderung menempel di dinding pembuluh darah sehingga lama kelamaan menimbulkan penyempitan pembuluh darah, berlanjut dengan gangguan jantung bahkan *stroke* (Ma, 2006). Kadar kolesterol dapat diturunkan salah satunya adalah dengan mengkonsumsi probiotik (Ooi, Gaik dan Liong, 2010). Sebelumnya Kusumawati (2003) menyatakan probiotik merupakan organisme hidup yang bila dikonsumsi dapat meningkatkan

kesehatan manusia ataupun ternak dengan cara menyeimbangkan mikroflora dalam saluran pencernaan.

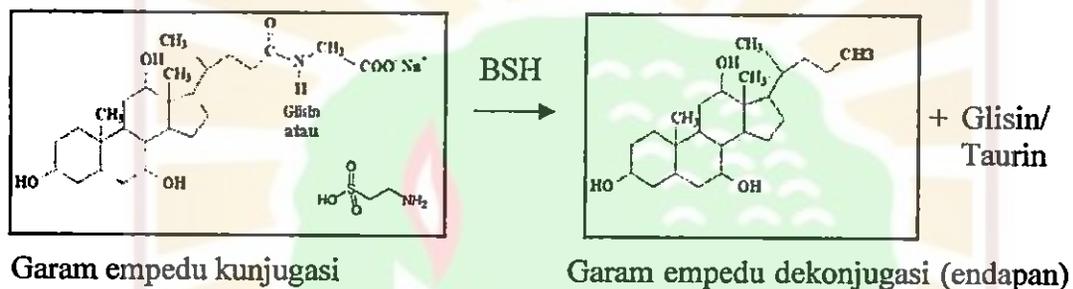
Pengaruh bakteri probiotik terhadap penurunan kadar kolesterol diduga karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol (Pereira *et al.*, 2002). Probiotik dapat juga mengkonjugasi asam empedu (Lamber, Riger, Willem dan Michiel, 2008). Sebelumnya Surono (2004) menyatakan bakteri asam laktat yang mempunyai kemampuan spesifik akan bekerja efektif apabila dapat bertahan pada kondisi yang ada dalam saluran pencernaan, oleh karena itu strain dari bakteri asam laktat tersebut harus tahan terhadap garam empedu dan kondisi asam lambung apabila dikonsumsi.

Proses dekonjugasi terjadi karena bakteri asam laktat memproduksi enzim BSH yang dapat menghidrolisis atau memutuskan ikatan C-24 N-Acyl Amida yang terbentuk diantara asam empedu dan asam amino pada garam empedu terkonjugasi. Proses dari dekonjugasi menghasilkan garam empedu terdekonjugasi *Unconjugated Bile Salt* yang memiliki tingkat solubilitas/kelarutannya di dalam pH fisiologis lebih rendah, sehingga garam empedu terdekonjugasi lebih hidrofobik, kurang ionik dan secara pasif dapat langsung diabsorpsi oleh mukosa usus kembali ke hati melalui peredaran darah. Garam empedu terdekonjugasi memiliki kemampuan antimikroba yang rendah, sehingga tidak terlalu membahayakan kehidupan bakteri (Astuti dan Ana, 2010).

Secara invitro apakah BAL positif mengandung Enzim BSH atau tidak, yaitu dengan menambahkan media MRS agar dengan senyawa taurin, dengan perlakuan kontrol (tanpa taurin) setelah inokulasi diinkubasi 37<sup>o</sup>C, selama 24 jam, akan terlihat positif mengandung enzim BSH, jika koloni memperlihatkan seperti

kabur, mengindikasikan terjadinya proses dekonjugasi dapat dilihat reaksinya pada Gambar 3 (Astuti dan Ana, 2010).

Pereira *et al.* (2003), telah melakukan uji *in vitro*, dengan menambahkan senyawa taurin kepada media MRS agar, ternyata strain BAL *Lactobacillus fermentum* pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 24 jam positif mengandung enzim BSH, dengan hasil kabur pada koloni strain BAL *Lactobacillus fermentum* yang diinokulasi pada media MRS agar + taurin tersebut.



Gambar 3. Peranan BAL membentuk asam empedu dekonjugasi (Sumber: Astuti dan Ana, 2010).

Garam empedu yang bergabung dengan taurin dan glisin merupakan garam empedu terkonjugasi. Garam empedu terkonjugasi adalah suatu senyawa amphipatik, yang salah satu sisinya dapat larut dalam air (*polar/hydrophilic*) dan sisi lainnya tidak larut dalam air (*nonpolar/hydrophobic*). Struktur amphipatik ini mampu mengakumulasi atau menggabungkan antara air dan minyak/ lemak dan menstabilkannya (Astuti dan Ana, 2010).

Lipid atau lemak di dalam makanan dicerna dalam jaringan usus dalam bentuk trigliserida (TG). Ada dua jenis TG yang ada dalam makanan, yaitu TG rantai sedang atau *Medium Chain Triglyceride* (MCT) dan *Long Chain Triglyceride* (LCT). Dalam usus LCT akan terurai menjadi asam lemak rantai panjang *Long Chain Fatty Acid* (LCFA) sedangkan MCT akan terurai menjadi

menjadi asam lemak rantai sedang *Medium Chain Fatty Acid* (MCFA). MCT lebih bersifat polar dibandingkan dengan LCT sehingga lebih mudah larut dalam air. MCT diserap usus secara langsung sehingga tidak memerlukan enzim pankreas lipase atau asam bile (asam empedu). LCT di dalam usus terlebih dahulu dirubah menjadi asam lemak dengan rantai yang lebih sederhana dengan menggunakan enzim pankreas lipase (Nur, 2005).

BAL selain menghasilkan asam laktat, BAL juga menghasilkan enzim lipase (Saarela *et al.*, 2000). Sudha, Prashant, Kalpana, Sekhar, dan Kaiser (2009) menyatakan, penurunan kadar TG oleh produksi enzim lipase yang dihasilkan bakteri probiotik, enzim ini mampu memecah lemak bermolekul besar menjadi substrat yang lebih kecil dan mudah dicerna. Sebelumnya Mahdavi *et al.* (2005) menjelaskan, BAL mampu mensintesis enzim esterase bersamaan dengan enzim lipase yang merubah asam lemak bebas menjadi bentuk ester yang berbeda dari trigliserida pada intestine. Ljungh dan Watsrom (2005) bahwa BAL mampu menfermentasikan dari asam lemak berantai panjang LCFA menghasilkan asam lemak rantai pendek *short chain fatty acid* (SCFA) di dalam usus.

Trigliserida dan kolesterol merupakan lipoprotein larut dalam air, yang keduanya diangkut dalam darah. Lipoprotein adalah partikel dengan bagian pusat non polar yang terdiri dari trigliserida dan kolesterol ester, dan sisi luar bersifat polar yang terdiri dari fosfolipid, kolesterol bebas dan protein. Lipoprotein dibagi kedalam lima kelas yaitu *chylomicrons* (CM), *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL) dan *high density lipoprotein* (HDL) (Smelt, 2010).

Mayahi (2009) telah berhasil meneliti pengaruh BAL dari spesies *Enterococcus faecium* dan *Bifidobacterium* dapat menurunkan kolesterol dan trigliserida pada ayam broiler. Musikasang, Tani dan Kittikun (2009) menemukan *Enterococcus durans* KT3L20 yang diisolasi dari usus halus pada ayam sebagai kandidat probiotik paling potensial hasil skrining dari beberapa bakteri asam laktat lainnya, karena sangat respon melawan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella sp* dan *Staphilococcus aureus*.

Penelitian Pato (2003), menemukan *Lactobacillus lactis* sebagai probiotik antikanker yang diisolasi dari dadih (susu kerbau fermentasi). Surono (2004) menyatakan bahwa, BAL *Lactobacillus acidophilus* mempunyai kemampuan menurunkan kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh dengan cara pengikatan kolesterol oleh BAL sehingga menyebabkan turunnya kadar kolesterol. Ignatova, Sredkova dan Marasheva (2009), memberikan probiotik *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* kepada ayam broiler, dan memberikan efek yang positif terhadap penurunan kadar kolesterol darah dan trigliserida. Lee *et al.* (2010) menemukan hasil skrining beberapa bakteri asam laktat, dan menemukan kandidat probiotik *Bifidobacterium longum* SPM1207 asal pangan probiotik Korea yang mampu menurunkan total kolesterol serum dan LDL yang sangat signifikan pada selang kepercayaan 5%, serta meningkatkan HDL serum dan menurunkan berat badan dari tikus pada hewan percobaan. Setelah itu Mansoub (2010) berhasil meneliti, yaitu pemberian BAL spesies *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei* sebanyak 0.5% berpengaruh terhadap penurunan kadar kolesterol dan trigliserida darah ayam broiler. Selanjutnya Purwati (2011) meneliti pemberian 3 ml ( $3.9 \times 10^8$  CFU/g) *Lactococcus*

*plantarum* asal blondo yang disertakan dalam ransum, dapat menurunkan kolesterol pada kuning telur ayam.

Banyaknya obat yang sudah ditemukan untuk mengatasi ancaman kolesterol, akan tetapi cara yang lebih aman dan alami untuk menurunkan kolesterol adalah lewat modifikasi pola makan dengan makanan fungsional yang mampu menurunkan kadar kolesterol. Salah satu strain BAL yang terdapat dalam dadih mampu menurunkan kadar kolesterol buruk (*Low Density Lipoprotein*), trigliserida, dan serum fosfolipid dalam darah tikus percobaan serta menurunkan serum asam empedu total. Strain bakteri asam laktat itu diduga mampu menempel di dinding usus tikus, berkembang biak, dan melakukan peran yang menguntungkan kesehatan lewat dekonjugasi garam empedu (Astuti dan Ana, 2010).

BAL dapat menurunkan kadar kolesterol darah sebesar 34 %. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL mampu melakukan metabolisme kolesterol yang berasal dari makanan menjadi bentuk sterol yang tidak diserap oleh usus. Oleh karena sterol tidak dapat diserap oleh tubuh maka sterol akan dikeluarkan melalui feses sehingga terjadi penurunan jumlah kolesterol yang diserap tubuh (Surono, 2004).

Beberapa contoh probiotik yang telah dipasarkan adalah *Lactobacillus casei* strain *Shirota*, diproduksi perusahaan dari Jepang. Bakteri ini mampu mengkolonisasi usus, *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 yang merupakan hasil penelitian VTT di Finlandia yang memiliki kemampuan antimikroba terhadap *Candida* dan patogen lain dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus reuteri* dihasilkan perusahaan Biogaia, Swedia. Jenis bakteri ini efektif melawan

penyebab diare pada anak-anak dengan menghasilkan antibakteri reuterin (Haryanto, 2004). Sebelumnya Coeuret, Gueguen dan Vernoux (2004) menginformasikan ada beberapa probiotik komersil disertai anjuran pemakaiannya, yaitu *Lactobacillus casei* dengan anjuran pemberian pada makanan tambahan (*food additif*) yaitu  $1,2 \times 10^6$ , *Enterococcus faecium* yaitu  $1,2 \times 10^6$ , *Lactobacillus casei* defensis digunakan untuk susu fermentasi dan starter pada yoghurt dengan anjuran  $10^9$ , *Lactobacillus casei* shirota yaitu  $2 \times 10^7$  terhadap fermentasi susu, sedangkan untuk suplemen nutrisi yaitu *Lactobacillus rhamnosus* GG dengan anjuran  $10^9$ , *Lactobacillus acidophilus* yaitu  $2,5 \times 10^8$ . Mahdavi (2005) menyatakan konsumsi probiotik secara teratur dapat mengurangi kadar kolesterol dan trigliserida secara signifikan. Sebelumnya Taranto, Medici, Perdigon, Holgado dan Valdez (2000) menyatakan, pemberian susu fermentasi yang mengandung bakteri *Lactobacillus casei* pada Syirian hamster selama 14 hari mampu menurunkan kadar trigliserida dalam darah mengamati adanya penurunan total kolesterol (22%) dan trigliserida (33%) dan menaikkan ratio HDL terhadap LDL sebesar 17 %.

#### 2.4. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan peptida antimikrobial (menghambat pertumbuhan bakteri patogen), mekanisme kerja bakteriosin dalam melawan bakteri lain secara umum dengan menyerang membran sitoplasma (Sablon, Contreras dan Vandamme, 2000), dan penembusan membran sel sehingga meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma atau penghambatan pembentukan septum (Martinez, Redriquez dan Suarez, 2000). Bakteriosin diproduksi untuk melawan bakteri Gram positif yang memiliki kekerabatan terhadap bakteri asam laktat yang

merupakan penghasil bakteriosin. Selain memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri, bakteriosin juga telah terbukti memiliki kemampuan dalam menghambat virus (Serkedjieva, Danova dan Ivanova, 2000).

Penamaan bakteriosin umumnya disesuaikan dengan bakteri penghasilnya, seperti *Lactococcin A*, *Lactococcin G*, *Lactococcin 972*, dihasilkan oleh bakteri *Lactococcus lactis*, *Enterococcin* (*Enterococcus faecalis*), *Carnobactericin* (*Carnobacterium piscicola*), *Acidolin*, *acidophilin*, *Lactacin* (*Lactobacillus acidophilus*), *Planticin* (*L. plantarum*) dan lain sebagainya (Heng, Wescombe, Burton dan Tagg, 2007).

Sutoyo (1998) telah mengisolasi bakteri asam laktat yang berasal dari rumen, feses ruminansia, dari buah-buahan, dan produk susu fermentasi, dari hasil uji skrining bakteriosin secara *in vitro* dari 206 isolat bakteri asam laktat tersebut didapatkan *Lactobacillus sp* DSS 2.1 yang signifikan melawan bakteri patogen *Listeria monocytogenesis*, akan tetapi tidak signifikan melawan pertumbuhan *Escherichia coli* pada pH 7. Osmanagaogeu, Beyatu dan Gunduz (2001) telah menemukan *Pediocin* yang potensial terhadap antimikrobia *Listeria*, *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*. Jamuna dan Jeevaratnam (2004) meneliti uji bakteriosin pada beberapa isolat bakteri asam laktat, ditemukan ada 3 spesies *Pediococcus*, yaitu *Pediococcus acidilactici* NCIM 2292, *Pediococcus pentosaceus* NCIM 2296 dan *Pediococcus cervisiae* NCIM 2171 yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas* pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 48 jam.

#### 2.4.1. Kinerja Bakteriosin dalam Aktivitas Antimikroba

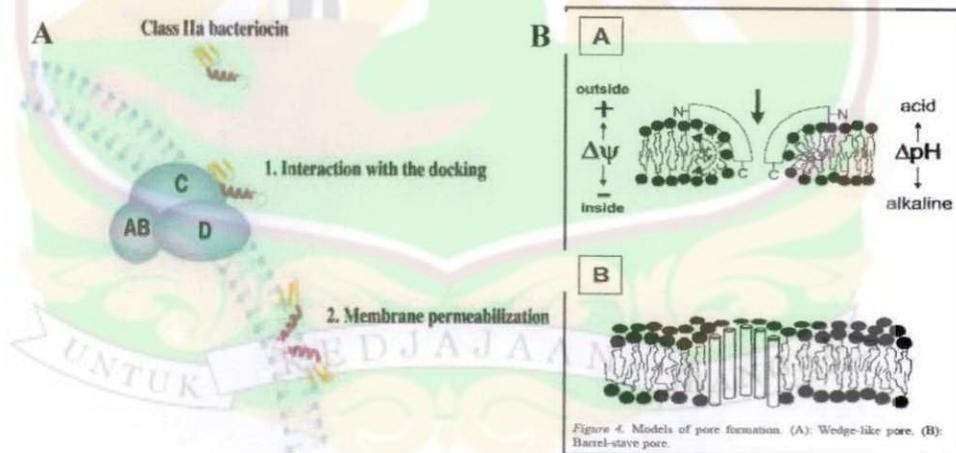
Target kerja bakteriosin dari BAL adalah membran sitoplasma sel bakteri yang sensitif, karena reaksi awal bakteriosin adalah merusak permeabilitas membran dan menghilangkan *Proton Motive Force* (PMF) sehingga menghambat produksi energi dan produksi protein atau asam nukleat (De Vuyst dan Vandam dalam Usmiati, 2007). Sebelumnya Drider, Fimland, Hechard, McMullen dan Prevost (2006) menyatakan, aktivitas menghambat bakteri membutuhkan reseptor spesifik permukaan sel, contohnya pada *Pediocin* AcH. Selain itu mengakibatkan terjadinya lisis pada sel, hal ini adalah efek sekunder dari aktivitas *Pediocin* AcH melalui depolimerisasi dari lapis peptidoglikan sehingga secara tidak langsung mengaktifkan sistem *autolysis* sel.

Nurhasanah (2004) menjelaskan, mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut:

1. Molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel.
2. Proses kontak mengganggu potensial membrane berupa destabilitas membrane sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat.
3. Kestabilan membran mampu memberi dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap PMF. Kebocoran yang terjadi akibat pembentukan lubang ditunjukkan adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler, kebocoran ini berdampak pada penurunan gradient pH seluler sehingga terjadi pelepasan molekul intraseluler dan masuknya substansi ekstraseluler. Efek ini menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel dan terjadi proses kematian pada sel yang

sensitif terhadap bakteriosin. Mekanisme biosintesis bakteriosin dapat dilihat pada Gambar 4.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat mengalami degradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan tidak membahayakan bagi kesehatan manusia. Selain itu, bakteriosin juga memiliki kestabilan terhadap pengaruh pH dan suhu. Bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas yang stabil pada kondisi asam maupun basa, sehingga sangat potensial dimanfaatkan oleh industri yang dalam prosesnya melibatkan kondisi asam maupun basa. Pengaruh suhu, bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas yang stabil setelah diberikan perlakuan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai  $100^{\circ}\text{C}$  sehingga sangat baik jika digunakan pada industri yang melibatkan kondisi panas maupun dingin pada proses produksinya sehingga dapat digunakan dalam proses di industri pangan yang biasanya melibatkan pengaturan suhu dan pH (Nurhasanah, 2004).



Gambar 4. Mekanisme aksi bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen, A= penempelan bakteriosin, B= pembentukan pori pada dinding sel (Drider *et al.*, 2006).

Cobos, Coss, Ramirez, Gonzalez, dan Cerrato (2011) menemukan *Pediococcus acidilactici* yang berasal dari fermentasi daging sosis, memiliki zona

hambat yang tinggi terhadap bakteri patogen *Listeria* dengan luas 115 mm<sup>2</sup>. Sebelumnya penelitian Ivanova, Kabadjova, Pantev, Danova dan Doussset (2000), menemukan *Lactococcus lactis* B14 fermentasi dari biji-bijian asal Bulgaria yang memiliki zona hambat yang tinggi terhadap bakteri uji (*Listeria innocua*) yaitu 10 mm. Savadogo, Ouattara<sup>1</sup>, Ouattara, dan Traore (2004), sebelumnya juga melakukan uji aktifitas antimikroba terhadap *Lactobacillus fermentum* dan *Pediococcus* asal susu fermentasi dihasilkan diameter zona hambat 8 mm-12 mm terhadap *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

Esayas, Fekadu dan Amutha (2008), meneliti daya hambat *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconosto*, dan *Pediococcus* yang berasal dari susu fermentasi, memiliki daya hambat terhadap *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dengan diameter sekitar 7 mm sampai 12 mm. Nurhajati, Indrawati dan Syaftika (2008), meneliti *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* asal fermentasi susu kedelai terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, dan *Salmonella typhosa*, memiliki diameter zona hambat 12 mm. Musikasang *at al.* (2009) meneliti aktifitas antimikroba bakteri asam laktat dari saluran pencernaan ayam, dihasilkan diameter zona hambat 8.7 mm pada isolat dengan kode KT10CE33. Urnemi, Syukur, Purwati, Ibrahim, Jamsari, Mustopa dan Kim (2011) melakukan uji aktifitas antimikrobial pada bakteri asam laktat asal kakao fermentasi 3 hari varietas *Trinitario* ditemukan diameter zona hambat 13 mm.

#### **2.4.2. Klasifikasi dan Pemurnian Bakteriosin.**

Bakteriosin diklasifikasikan menjadi tiga grup yaitu bakteriosin kelas satu, bakteriosin kelas 2, serta bakteriosin kelas 3. Masing-masing kelas memiliki ciri-

ciri yang berbeda. Bakteriosin kelas satu merupakan bakteriosin yang terdiri atas satu atau dua peptida kecil dan merupakan peptida yang termodifikasi pada post-translasi, ukuran peptida ini sekitar 3 kDa. Bakteriosin ini juga disebut lantibiotik karena memiliki modifikasi struktur yang mengandung lanthionin,  $\beta$ -metillanthionin, dan asam amino terdehidrasi. Lantibiotik juga terbagi menjadi 2 subkelas yaitu tipe A dan tipe B. Lantibiotik tipe A yang telah banyak adalah nisin. Lantibiotik tipe A merupakan molekul yang fleksibel terelongasi dengan muatan positif serta memiliki aktivitas depolarisasi membran. Lantibiotik tipe B memiliki bentuk globular dan mengganggu sintesis dinding sel (Surono, 2004).

Grup ke dua dalam bakteriosin adalah bakteriosin kelas 2. Bakteriosin kelas 2 memiliki ukuran yang kecil yaitu kurang dari 5 kDa dan terbagi menjadi 2 subkelas yaitu kelas IIa dan kelas IIb. Bakteriosin kelas IIa merupakan bakteriosin yang banyak ditemukan pada bermacam-macam bakteri asam laktat (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, dan *Leuconostoc*). Bakteriosin tersebut memiliki kesamaan 40% - 60% sekuens asam amino dengan karakteristik sekuens terkonservasi, serta residu sistein membentuk ikatan disulfida pada daerah N-terminal. Bakteriosin tipe ini dikenal sebagai pengawet makanan karena dapat menghambat aktivitas bakteri patogen bawaan pangan. Bakteriosin kelas IIb mengandung 2 peptida yang terpisah. Bakteriosin kelas I dan II memiliki target membran sitoplasma bakteri gram positif. Bakteriosin kelas I dan II bersifat stabil terhadap suhu panas. Bakteriosin tipe III yang telah dikenal adalah *helveticin*. Bakteriosin ini merupakan bakteriosin yang terakhir dikarakterisasi. Bakteriosin tipe III bersifat tidak stabil terhadap suhu panas.

Bakteriosin ini juga memiliki ukuran yang lebih besar dari 30 kDa (Yoneyama *et al.*, 2009).

Penggolongan bakteriosin didapatkan setelah dilakukan karakterisasi dan purifikasi/pemurnian bakteriosin. Karakterisasi yang umum dilakukan adalah uji kestabilan pH, suhu, optikal densiti, uji optimasi determinasi bobot molekul bakteriosin dengan menggunakan SDS-PAGE. Pemurnian bakteriosin dilakukan dengan beberapa tahapan, tahapan pertama bertujuan memisahkan antara debris sel dan komponen intraseluler (supernatan). Supernatan yang dihasilkan masih mengandung banyak komponen intraseluler sehingga diperlukan purifikasi (Serkedjiewa *et al.*, 2000).

Guyonnet, Fremaux, Cenatiempo dan Berjeaud (2000) menyatakan bahwa, bakteriosin dapat dipisahkan dengan komponen intraseluler lainnya dengan menggunakan teknik presipitasi ammonium sulfat. Teknik presipitasi ammonium sulfat memiliki prinsip *salting out*. Penambahan ammonium sulfat sebagai garam dalam tingkat kejenuhan tertentu dapat mengendapkan protein tertentu. Beberapa protein dapat bakteriosin dapat diendapkan dengan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang rendah. Gautam dan Sharma (2009) menyatakan bahwa, ada bakteriosin tertentu dapat yang diendapkan dengan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang tinggi, yaitu diperlukan presipitasi amonium sulfat 60%, 70%, 80% dan 90%. Peptida yang terendapkan melalui proses *salting out* tersebut di presipitasi melalui sentrifugasi. Pemurnian selanjutnya menggunakan kromatografi gel filtrasi yang menggunakan sphadex atau sepharose, biasa menggunakan sephadex G-50 dapat memisahkan protein dari ukuran 1.5 kDa – 30 kDa. Eluen yang digunakan merupakan pelarut polar. Beberapa bakteriosin

memiliki kemampuan untuk larut dengan beberapa pelarut seperti akuades, buffer fosfat, metanol dan Tris-HCl.

Chien, Yin dan Tzong (2004) melakukan karakterisasi dan purifikasi terhadap bakteriosin Pediosin *Pediococcus pentosaceus* ACCEL, ditemukan bobot molekul proteinnya 17.5 kDa, stabil pada suhu 121<sup>o</sup> C 15 menit, dan pada pH 2.0-4.0. Sahar, Deraz, Martin, Eva, Sara, Ashraf dan Mattiasson (2005), melakukan purifikasi dan determinasi bobot molekul protein dengan menggunakan SDS-PAGE terhadap *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 asal pangan fermentasi, ditemukan bobot molekul 6.6 kDa. Daniel, Barbosa, Albano, Silva, Gibbs dan Teixeira (2007), melakukan purifikasi dan karakterisasi determinasi bobot molekul protein *Pediococcus pentosaceus* K34 asal fermentasi daging, dengan menggunakan SDS-PAGE, didapatkan bobot molekul protein berkisar 6.2 kDa, dan sensitif terhadap *Listeria*. Karthikeyan dan Santosh (2009) melakukan purifikasi terhadap *Lactobacillus acidophilus* asal usus udang laut ditemukan, bobot molekul terhadap protein 2.5 kDa, stabil pada suhu 50<sup>o</sup>C, pH 4 dan 0.9 NaCl. Halami dan Prakash (2010) melakukan hal yang sama terhadap *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 asal fermentasi kacang-kacangan ditemukan bobot molekul protein 4.8 kDa.

## 2.5. *Pediococcus sp.*

*Pediococcus sp* adalah bakteri berbentuk coccus, Gram-positif, anaerob, *non-motile*/tidak bergerak, digolongkan sebagai “bakteri asam laktat” (Caldwell, Hutkins, McMahan, Oberg, dan Broadbent, 1998.). *Pediococcus sp.* umumnya ditemukan di fermentasi susu, daging, bekasam ikan. BAL ini banyak digunakan pada industri pangan sebagai starter pada keju, sosis, olahan daging, bakso, juga

pada olahan sayur-sayuran. Sekarang ini banyak penelitian mencari *Pediococcus* *sp* strain lain yang lebih potensial untuk menemukan agen anti-mikroba (bakteriosin) terhadap pemeliharaan makanan *food safety*. Telah ditemukan beberapa hasil penelitian tentang potensial dan karakterisasi *Pediococcus* *sp*, walaupun spesies yang ditemukan sama, akan tetapi potensial antimikroba/bakteriosin dan bobot molekul protein yang dimilikinya berbeda (Syukur dkk., 2011).

*Pediococcus pentosaceus* umumnya digunakan pada pangan industri. Bakteriosin yang diproduksi oleh *Pediococcus pentosaceus* digunakan sebagai bahan pengawet makanan alami *food preservative*. Bakteriosinnya lebih sensitif terhadap patogen *Listeria monocytogenes*, yang menyebabkan *Listeriosis* (Osmanagaoglu *et al.*, 2001). Di Negara Cina, para ilmuwan sedang berusaha untuk mengembangkan satu kultur starter yang menggunakan *Pediococcus pentosaceus* kedalam air bersih cagar alam sebagai pengganti garam beryodium untuk masyarakat, dan digunakan juga pada produk daging. Para peneliti saat ini menggunakan kultur *Pediococcus pentosaceus* untuk pengawet ikan air tawar, sebagai pengganti atau mengurangi konsumsi garam (Hu, 2006).

## **2.6. Review Penelitian Probiotik BAL dan *Pediococcus* *sp*.**

Review penelitian tentang isolasi bakteri asam laktat asal berbagai produk fermentasi dan potensial antimikrobial, serta karakterisasi bakteriosin spesies *Pediococcus pentosaceus* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Isolasi spesies *Pediococcus pentosaceus* karakterisasi dan purifikasi bakteriosin dari berbagai produk fermentasi

No	Bakteriosin	Sumber	Sifat/Karakter	Referensi
1.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sosis produk olahan daging	Stabil suhu tinggi yaitu 121 °C selama 15 menit dan sensitif terhadap enzim proteolitik.	Osmanatıaoğlu <i>et al.</i> (2001)
2.	<i>Pediocin</i>	Fermentasi daging babi	Bobot molekul proteinnya 25 kDa.	Li-Jung <i>et al.</i> (2003)
3.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ACCEL	-	Pemurnian bakteriosin dengan kolom kromatografi dengan fase diam sepharose, menghasilkan bakteriosin berkisar 17.5 kDa. Stabil pada suhu 121°C 15 menit, stabil ppada pH2.0-4.0	Chien-Wei <i>et al.</i> 2004.
4.	<i>Pediococcus</i>		Sensitif terhadap <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus</i> , diameter zona hambat 8 mm -12 mm	Savadogo <i>et al.</i> (2004)
5.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> K34	Fermentasi sausage/daging	Bakteriosin sensitif terhadap <i>listeria</i> , Bobot molekul protein bakteriosi berkisar 6.2 kDa.	Daniël <i>et al.</i> (2007)
6.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Susu fermentasi	Diameter zona hambat 7 mm-12 mm Terhadap <i>Salmonella typhi</i>	Esayas <i>et al.</i> (2008)
7.	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Fermentasi daging babi	Bakteriosin sensitif terhadap <i>Enterococcus faecalis</i> , parsial purifikasi bobot protein bakteriosin disekitar 10.3 kDa.	Mandal <i>et al.</i> (2011)
8.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KACC 91419	Garlic fermentation (fermentasi bawang putih)	Bakteriosin sensitif terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhirium</i>	Ham <i>et al.</i> (2010)
9.	<i>Pediosin</i> dari <i>Pediococcus acidilactici</i> strain K2a2-3	Saluran pencernaan/usus kerbau	Antilisteria, bobot molekul protein sekitar 4,625 Da.	Karen <i>et al.</i> (2010)
10.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CFR B19	Dari kacang-kacangan	Antilisteria, stabil suhu 121°C 15 menit, hasil purifikasi, bobot protein bakteriosin berkisar 4.8 kDa.	Halami dan Prakash, 2010

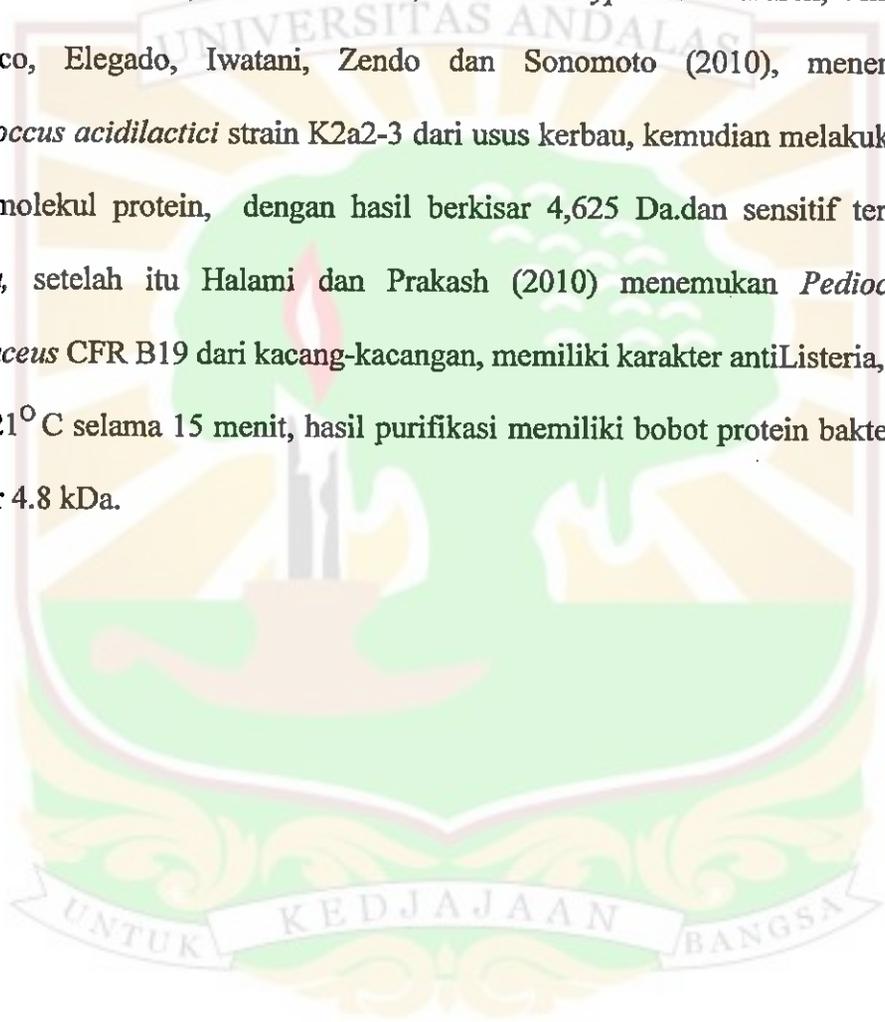
Osmanaúaoulu, Beyatli dan Gunduz (2001), telah melakukan karakterisasi terhadap isolat *Pediococcus pentosaceus* asal olahan daging (sosis), dihasilkan pediosin yang sensitif terhadap antilisteria, kemudian dihasilkan bakteriosinnya stabil pada suhu diatas 100<sup>o</sup> C. Penelitian Li-Jung dan Watsrom (2003), *Pediococcus pentosaceus* dengan bobot bakteriosin yaitu 25 kDa yang diisolasi dari fermentasi daging babi.

Selanjutnya Chien-wei, Li-Jung, dan Shann-Tzong (2004) melakukan purifikasi dan karakterisasi *pediocin* dari *Pediococcus pentosaceus* ACCEL, didapatkan bobot molekul pediosin berkisar antara 17.5 kDa, stabil pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit. Savadogo, Chien, Yin dan Shann-Tzong (2004) melakukan karakterisasi terhadap *Pediosin* dari *Pediococcus sp.*, ditemukan pediosin dengan karakter sensitif terhadap *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* dan memiliki aktivitas antimikrobial dengan diameter zona hambat 8 mm - 12 mm.

Daniel *et al.* (2007) melakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi molekuler terhadap *Pediococcus pentosaceus*, ditemukan antibakterial sensitif terhadap *Listeria* dan *Enterococcus*, bobot molekul berkisar 6.2 kDa *Crude pediocin* adalah 2.5 kDa hasil pemurnian, stabil pada suhu 60<sup>o</sup> C sampai 100<sup>o</sup> C. Banyak peneliti probiotik menskrining BAL antilisteria dari produk fermentasi lainnya (tanaman dan hewan), stabil pada suhu diatas 100<sup>o</sup> C, yang akan digunakan sebagai bahan pengawet alami *food preservative*. Asumsinya akan ditemukan antilisteria yang lebih potensial dengan strain yang berbeda dari berbagai produk fermentasi. Esayas *et al.* (2008) meneliti uji aktivitas antimikrobial dari *Pediococcus pentosaceus* dengan hasil diameter zona hambat

yaitu 7 mm - 12 mm terhadap. Mandal *et al.* (2008) dengan hasil penelitian fermentasi daging babi, menemukan *Pediococcus acidilactici* dengan bobot molekul protein berkisar antara 10,3 kDa.

Ham *et al.* (2010) menemukan *Pediococcus pentosaceus* KACC 91419 hasil fermentasi bawang putih, dan bakteriosinnya sensitif terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhirium*. Karen, Villarante, Francisco, Elegado, Iwatani, Zendo dan Sonomoto (2010), menemukan *Pediococcus acidilactici* strain K2a2-3 dari usus kerbau, kemudian melakukan uji bobot molekul protein, dengan hasil berkisar 4,625 Da. dan sensitif terhadap *Listeria*, setelah itu Halami dan Prakash (2010) menemukan *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 dari kacang-kacangan, memiliki karakter anti *Listeria*, stabil suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit, hasil purifikasi memiliki bobot protein bakteriosin berkisar 4.8 kDa.



### **III. MATERI DAN METODA PENELITIAN**

#### **3.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, Laboratorium Bioteknologi Virologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong Bogor. Untuk uji biologis dilaksanakan di Kecamatan Damasraya, Kabupaten Sijunjung Sumatera Barat. Penelitian dilakukan mulai bulan Januari 2010 sampai dengan bulan Oktober 2011. Diagram Alir penelitian secara detil dapat dilihat pada Lampiran 1.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap percobaan yaitu :

#### **3.2. Penelitian Tahap Pertama :**

##### **3.2.1. Isolasi, Pemurnian, Karakteristik Koloni BAL Konvensional**

3.2.1.1. Isolasi dan pemurnian koloni BAL

3.2.1.2. Karakteristik Koloni dan Sel BAL konvensional

##### **3.2.2. Seleksi Bakteri Asam Laktat Potensial Aktivitas Antimikroba (Skrining BAL)**

##### **3.2.3. Karakterisasi (Stabilitas pH, Stabilitas Suhu, Optikal Densiti) Bakteriosin BAL Potensial Sebagai Kandidat Probiotik**

3.2.3.1. Stabilitas pH kultifasi BAL potensial probiotik pada aktivitas bakteriosin

3.2.3.2. Stabilitas suhu kultifasi BAL probiotik pada aktivitas bakteriosin

3.2.3.3. Tingkat kekeruhan (optikal densiti) BAL pribiotik (HB 3.3)

### **3.2.4. Purifikasi Parsial Bakteriosin Isolat BAL Probiotik Dan Pengukuran Aktivitas Inhibisi Bakteriosin**

3.2.4.1. Purifikasi parsial bakteriosin BAL probiotik (Hb3.3)

3.2.4.2. Uji determinasi bobot molekul protein bakteriosin BAL probiotik dengan metoda *Elektroforesis Gel Poliakrilamid Sodium Dedosil Sulfanat* ( SDS-PAGE )

### **3.2.5. Identifikasi Lima Isolat Bakteri Asam Laktat**

3.2.5.1. Isolasi DNA

3.2.5.2. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

3.2.5.3. Gel elektroforesis

3.2.5.4. Purifikasi DNA dengan Promega Kit Protokol

3.2.5.5. Analisis data sekuensing

### **3.3. Penelitian Tahap Dua :**

#### **3.3.1. Uji Biologis Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap Kadar Kolesterol pada Daging Itik Pitalah.**

3.3.1.1. Penghitungan koloni bakteri *Pediococcus pentosaceus* digunakan sebagai probiotik pada itik Pitalah

3.3.1.2. Pengaruh probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap kadar kolesterol (mg/dl) daging itik Pitalah

3.3.1.3 Pengaruh probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap kadar trigliserida pada telur Itik Pitalah

3.3.1.4. Pengaruh probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap bobot badan itik Pitalah (kg/ekor)

## **Percobaan Tahap 1:**

### **3.2.1. Isolasi, Seleksi Potensi Aktifitas Antimikroba, Karakterisasi, Purifikasi Parsial dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Fermentasi Biji Kakao asal Sumatera Barat**

Percobaan tahap pertama bertujuan mendapatkan isolat BAL dari fermentasi 3 varietas kakao asal Sumatera Barat yang mempunyai potensi untuk dijadikan probiotik pada itik Pitalah. Metoda isolasi dapat dilihat pada lampiran 2. Isolat murni diperoleh setelah dilakukan pemurnian sebanyak tiga kali, kemudian diidentifikasi secara konvensional morfologi BAL dengan pewarnaan Gram positif.

Identifikasi isolat BAL secara konvensional yaitu dengan melakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap koloni BAL meliputi: warna, bentuk, permukaan, bau dan pinggiran koloni. Sebelum uji morfologi BAL dilakukan penghitungan koloni. Setelah didapatkan beberapa isolat BAL dilakukan seleksi potensi BAL terhadap aktivitas antimikroba (skrining BAL), kemudian dipilih BAL paling potensial yang akan dijadikan kandidat probiotik, probiotik tersebut dikarakterisasi (stabilitas pH, suhu, optikal densiti). Probiotik tersebut dipurifikasi parsial dengan presipitasi ammonium sulfat yang diuji bakteriosinnya, yang paling tinggi zona hambatnya dideterminasi bobot bakteriosinnya dengan SDS-PAGE. BAL yang berpotensi diidentifikasi molekular dengan 16S rRNA.

- **Bahan dan Alat**

Bahan yang dibutuhkan yaitu biji kakao varitas hijau (*Criollo*), merah (*Forestero*) dan hibrid (*Trinitario*) yang berasal dari Desa Pedusunan Kabupaten Padang Pariaman yang difermentasi untuk mendapatkan isolat BAL.

Isolasi BAL dibutuhkan media *de Mann Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) dan *de Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) (Merck) yang terdiri dari ( 15 g pepton, 5 g ekstrak ragi/yeast, 10 g dekstrosa, 5 g jus tomat, 2 g monopotassium fosfat dan 1 g polisorbat 80), bakto agar, natrium azida. Untuk pewarnaan Gram dibutuhkan larutan iodin kompleks, safranin dan zat warna Kristal violet, alkohol dan akuades. Untuk daya simpan BAL adalah alkohol, eter dan HCl, gliserol steril 50% dan media MRSB.

Untuk seleksi BAL terhadap aktivitas antimikroba, karakterisasi, purifikasi parsial, identifikasi molekular dibutuhkan media *Nutrient* untuk bakteri patogen (Beef Ekstrak, pepton, NaCl, bakto agar), akuades steril, natrium azida, *penicillin*, ammonium sulfat 20%, 20%, 60%, 80% dan 90%, 500 µl, Tris-EDTA (TE), (10 mM Tris HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 7,6), lysozim 40 µl, 200 µl 10 % SDS, NaCl 5 M, 80 µl CTAB 10%, kloroform pa (100%) (1 : 1 perbandingan dengan vilume sampel), etanol 70 %, 27µl ddH<sub>2</sub>O, 3 µl RNAase, bahan gel SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) 18-20%, *Coomassie brilliant blue*, marker protein 10.000-40.000 Da, Tris-HCl pH 8, akuabides (ddH<sub>2</sub>O), buffer 1 x TE (Tris EDTA), SDS 10%, *proteinase K* (10 mg/µl), fenol: kloroform : isoamilalkohol (25 : 24 : 1), NaCOOH 3 M, isopropanol, etanol 70%, agarose, buffer 0,5 x TBE (Tris-Boric-EDTA), *etidium bromida*, 10 x *Bromo Phenol Blue* (BPB), primer.

Alat yang diperlukan adalah kotak fermentasi untuk fermentasi biji kakao, termometer, pH meter. Untuk pembuatan media dan Isolasi BAL diperlukan autoklaf, inkubator, vortek, *laminar air flow cabinet* (L AFC), timbangan analitik, gelas ukur, *hot plate*, *hockey stick*, tip pipet mikro, pipet mikro 100 µl, 200 µl, 1000 µl, mikroskop, bunsen, cawan petri, *ependorf* 1 ml,

jarum ose, kaca benda (preparat), diperlukan kertas steril (*paper sterile test*) untuk difusi bakteri patogen, sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm dan 15.000 rpm. Alat SDS-PAGE, *eppendorf* mini, pipet mikro 20  $\mu$ l, PCR, UV, peralatan elektroforesis.

- **Metoda Penelitian**

- Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media yang Digunakan**

Alat gelas dibungkus dengan aluminium foil, pipet mikro, *hockey stick* diletakan dalam wadahnya, ditutup rapat dan diberi selotip, tabung *eppendorf* dimasukan kedalam baker gelas, lalu ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 lb selama 15 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan dibakar di atas api bunsen hingga membara, dibiarkan sebentar sebelum digunakan. Sebelum menggunakan Laminar Air Flow Cabinet (L AFC), disterilkan dengan menggunakan UV selama 30 menit sebelumnya telah disemprot dengan alkohol 70%.

- Pembuatan Media**

- **Pembuatan Media *de Mann Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) (Merck)**

*de Mann Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) (Merck) (ditimbang 52,2 g dalam erlenmeyer 2000 ml, lalu dilarutkan dalam 1000 ml aquades, ditambahkan sodium azaid 1 ml, kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 lb selama 15 menit.

- **Pembuatan Media *de Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) (Merck)**

*de Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) (ditimbang 68,2 g dalam erlenmeyer 2000 ml lalu dilarutkan dalam 1000 ml aquades, ditambahkan sodium azaid 1 ml, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 lb selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril sebanyak 15 ml lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

- **Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB) (Merck)**

Ditimbang beef ekstrak 0.3 g, 1 g Pepton, 0.5 g NaCl ditambahkan akuades sebanyak 100 ml, kemudian dimasukan kedalam erlenmeyer 250 ml. kemudian disterilkan pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 lb selama 15 menit pada autoklaf.

- **Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) (Merck)**

Ditimbang Beef Ekstrak 0.3 g, 1 g Pepton, 0.5 g NaCl ditambahkan bakto Agar sebanyak 1.8 g dan akuades sebanyak 100 ml kedalam erlenmeyer 250 ml, disterilkan pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 15 lb selama 15 menit pada autoklaf. Dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

### **3.2.1. Isolasi, Pemurnian dan karakterisasi konvensional Bakteri Asam Laktat asal Fermentasi Biji Kakao**

#### **3.2.1.1. Isolasi dan pemurnian koloni BAL**

Metoda isolasi bakteri asam laktat (BAL) ini adalah menurut Purwati, Syukur dan Hidayat (2005) (Lampiran 2), dimulai dengan proses pengkayaan (*enrichment*), yaitu 1 g sampel masing-masing varietas 2 dan 3 hari fermentasi biji

kakao dicampurkan kedalam 9 ml MRSB (Merck), dihomogenkan sehingga didapatkan pengenceran 1 : 9 atau  $10^{-1}$ . Sampel yang telah diinokulasi pada media diinkubasi di dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Sampel diencerkan menggunakan 0.9 ml MRSB pada tabung eppendof melalui proses pengenceran (serial delution) sampai  $10^{-7}$  dengan cara diambil 0.1 ml dari pengkayaan (*enrichment*/  $10^{-1}$ ) lalu ditambahkan kedalam tabung eppendof yang berisi 0.9 ml MRSB, sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-2}$ , diambil 0.1 ml dari pengenceran  $10^{-2}$  ditambahkan kedalam tabung eppendof yang berisi 0.9 ml MRS broth sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-3}$  dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran  $10^{-7}$ . Dilanjutkan dengan proses penanaman (*planting*) dimana diambil 0.1 ml dari tabung eppendof pada pengenceran  $10^{-7}$  kemudian ditanam pada medium MRSA, diratakan dengan menggunakan *hockey stick*, diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Difoto dan dihitung dengan menggunakan alat penghitung koloni *Quebec Colony Counter* teknik penghitungan koloni terdapat pada (Lampiran 3). Hasil isolasi ini digunakan untuk pemurnian dan identifikasi morfologi BAL dengan pewarnaan Gram positif. Pada hasil isolasi BAL, ditemukan koloni tunggal yang mencirikan bakteri asam laktat yaitu putih mengkilat seperti susu, ada juga yang putih kekuningan, permukaan cembung, dipindahkan ke media MRSA untuk dilakukan pemurnian, yaitu dengan melakukan strik pada 4 bagian permukaan pada media MRSA, dimulai pada bagian pertama, dilanjutkan kebagian kedua, ketiga dan keempat secara tidak terputus. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , diulang sebanyak 3 kali. Isolat BAL yang telah murni ini akan digunakan pada uji selanjutnya (Purwati, 2003).

### 3.2.1.2. Karakterisasi sel BAL konvensional

Identifikasi morfologi BAL (pewarnaan Gram positif) dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi makroskopis dan mikroskopis. Makroskopis yang diamati adalah bentuk, warna, tepian koloni BAL yang tumbuh pada medium MRSA. Identifikasi mikroskopis yaitu bentuk sel, dan identifikasi fisiologis dengan Gram (Unus, 2005). Pewarnaan diawali dengan pengambilan biakan bakteri tunggal dari medium dengan menggunakan jarum ose, bakteri diratakan di atas kaca preparat yang telah dibersihkan dengan alkohol, lalu dikeringkan di atas bunsen atau alat pengering, ditetesi dengan zat warna kristal violet, kemudian ditunggu selama 1 menit agar zat warna meresap oleh bakteri, lalu dibilas dengan air mengalir dan ditetesi dengan larutan iodin kompleks, kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir, dicuci dengan alkohol dengan cara dicelupkan ke dalam alkohol encer, ditetesi dengan zat warna safranin, lalu ditunggu 30 detik, setelah itu dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop 10 kali lipat dapat dilihat hasil uji Gram bakteri (Purwati, 2003 dan Unus, 2005) (Lampiran 4).

### 3.2.2. Seleksi Bakteri Asam Laktat Potensial Aktivitas Antimikroba (Skrining BAL)

Uji aktivitas antimikroba 66 isolat BAL terhadap lima bakteri uji (*Escherichia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Bacillus subtilis* BTCCB, *Salmonella thypii* dan *Listeria monocytogenesis*). Metoda yang digunakan adalah metoda difusi pada kertas test steril (diffusion method steril paper test), sebanyak 50 µl kultur BAL disentrifugasi 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 40<sup>o</sup> C. Dituang ke dalam cawan petri steril. Dibiarkan selama 30 menit agar mengeras, kemudian pada NA (Nutrient Agar) diletakan kertas test steril. Didifusikan 20 µl supernatan BAL, diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C secara anaerob. Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke-3, 5, 8, 24 dan 48 jam (Mustopa, 2010).

### **3.2.3. Karakterisasi (Stabilitas pH, Stabilitas Suhu, Optikal Densiti) Bakteriosin BAL Potensial sebagai Kandidat Probiotik**

#### **3.2.3.1. Stabilitas pH kultifasi BAL potensial probiotik pada aktivitas bakteriosin**

Isolat BAL terpilih (hasil skrining uji aktifitas antimikrobia 66 isolat BAL, dipilih 1 isolat yang paling potensial daya antimikrobia) dikultur pada berbagai pH seperti 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 24 jam, masing-masing kultur pada berbagai pH disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4<sup>o</sup>C, supernatan berbagai pH tersebut diuji bakteriosinnya terhadap 5 bakteri patogen (bakteri indikator). Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke-3, 5, 8, 24 dan 48 jam (Mustopa, 2010).

#### **3.2.3.2. Stabilitas suhu kultifasi BAL probiotik pada aktivitas bakteriosin**

Efek uji stabilitas suhu dilakukan dengan pemanasan supernatan mulai suhu 45<sup>o</sup> C, 60<sup>o</sup> C, 75<sup>o</sup> C, 90<sup>o</sup> C, 100<sup>o</sup> C, 121<sup>o</sup> C, selama 15, 30, 45 dan 60 menit, kemudian diuji bakteriosin terhadap 5 bakteri patogen (bakteri indikator). Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke-3, 5, 8, 24 dan 48 jam (Mustopa, 2010).

### **3.2.3.3. Tingkat kekeruhan (optikal densiti) BAL probiotik (Hb3.3)**

Satu isolat BAL terpilih ditumbuhkan dalam media MRS broth sebanyak 200 ml, pada suhu 37°C selama 24 jam. Setiap satu jam BAL yang telah dikultur diambil sebanyak 1 ml ke tabung reaksi, kemudian dipindahkan ke tabung Eppendof, kemudian dibaca absorbannya dengan menggunakan serapan panjang gelombang 595 nm (Usmiati dan Marwati 2007).

### **3.2.4. Purifikasi Parsial Bakteriosin Isolat BAL Probiotik dan Determinasi Bobot Molekul Bakteriosinnya**

#### **3.2.4.1. Purifikasi parsial bakteriosin isolat BAL probiotik dan pengukuran aktivitas inhibisi bakteriosin**

Purifikasi bakteriosin dari bakteri *asam* laktat dilakukan berdasarkan modifikasi metode Serkedjieva *et al.* (2000). Supernatan isolat BAL dipresipitasi dengan 20%, 40%, 60%, 80% dan 90% ammonium sulfat, yaitu dengan cara ammonium sulfat digerus hingga menjadi bubuk. Setelah itu setiap 5 menit dimasukan ammonium sulfat 0,5 g ke dalam supernatan pada suhu 4<sup>o</sup> C. Kemudian diendapkan selama 12 jam, hasil semua presipitasi amonium sulfat tersebut diendapkan selama 12 jam. Hasil pengendapan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4<sup>o</sup> C. pellet yang didapatkan diresuspensi menggunakan Tris-HCl 10mM pH 7,4. Setelah itu ekstrak kasar tersebut diuji aktifitas inhibisinya terhadap pertumbuhan lima bakteri patogen (uji aktivitas antimikroba). Dipilih hasil presipitasi yang memiliki diameter zona hambat tertinggi, dilakukan determinasi bobot molekul protein SDS-PAGE.

### **3.2.4.2. Uji determinasi bobot molekul protein bakteriosin BAL probiotik dengan metoda *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* ( SDS-PAGE )**

Supernatan dari isolat diuji bobot molekul protein bakteriosin dengan menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS PAGE). Gel poliakrilamid 18-20% dibuat dengan cara, sukrosa dicampurkan dengan poliakrilamid, aquades, TEMED, dan ammonium persulfat, kemudian gel dibiarkan memadat (*The Royal Society of Chemistry, 2010*).

Sampel dicampurkan dengan *loading dye* dan didenaturasi pada suhu 95°C selama 10 menit. Perangkat gel elektroforesis dipasang dengan gel poliakrilamid yang telah memadat. Buffer running SDS-PAGE dimasukkan kedalam perangkat SDS-PAGE. Sampel dimasukkan sebanyak 20 µl ke dalam sumur agar elektroforesis dan marker sebagai pembanding. Setelah selesai elektroforesis SDS poliakrilamid, gel diwarnai dengan pewarnaan perak (*silver staining*) hingga muncul pita-pita setelah bakteriosin dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE (*The Royal Society of Chemistry, 2010*).

### **3.2.5. Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Potensial**

#### **3.2.5.1. Isolasi DNA**

Diinokulasikan kultur BAL ke dalam 3 ml MRS broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 24 jam, diambil 1 ml kemudian dipindahkan ke eppendorf steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4<sup>o</sup> C selama 15 menit. Pellet digunakan untuk isolasi genomik DNA dan supernatan digunakan untuk uji bakteriosin. Untuk isolasi genomik DNA pellet ditambah 500 µl Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). Ditambahkan *Lysozyme* 40 µl dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37<sup>o</sup> C,

setelah itu ditambahkan 200  $\mu$ l 10 % SDS, 100 cc NaCl 5M dan 80  $\mu$ l CTAB 10 % (sebelum digunakan CTAB dipindahkan ke eppendorf 1 ml dan ditambah 20  $\mu$ l mercapetanol), kemudian dipanaskan pada suhu 68<sup>o</sup> C selama 30 menit (dibolak-balik setiap 10 menit), lalu didinginkan sebentar kemudian ditambahkan kloroform PA (100 %) (1 : 1 perbandingan dengan volume sampel), setelah itu disentrifugasi 10 000 rpm (4<sup>o</sup> C) selama 15 menit, lalu supernatan yang bagian paling atas (bening) diambil dan dipindahkan ke eppendorf, kemudian tambahkan etanol 100% (dingin) sebanyak 1 kali volume sampel. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4<sup>o</sup> C selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu eppendorf dicuci dengan etanol 70% sebanyak 0,5 ml, disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4<sup>o</sup> C, selanjutnya eppendorf dimiringkan selama 1 jam di atas tissue sampai cairan kering, kemudian ditambahkan 27  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dan 3  $\mu$ l RNase, diinkubasi 30 menit pada suhu 37<sup>o</sup> C, lalu disimpan di -20<sup>o</sup> C (Purwati, 2003; Jamsari, 2007; Kim dan Cho *et al.*, 2010).

### **3.2.5.2. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Gen 16S rRNA dari genomik DNA yang diisolasi dari koloni BAL murni diamplifikasi dengan PCR. Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dalam *Thermocycler Mupid-Exu* dengan menggunakan primer 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1541(5'AAGGAGGTGATCCAGCC). DNA template 3  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tube. Untuk reaksi PCR, 38,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, primer F dan R masing-masing 0,5  $\mu$ l dan 2  $\mu$ l 2,5 mM dNTP, *taq*

*polymerase* 0,5 µl dan 10 x buffer 5 µl dibuat dalam tube 1,5 ml. Sebanyak 47 µl bahan di atas ditambahkan ke dalam eppendorf DNA template. Protokol PCR terdiri dari 35 siklus PCR (denaturasi 96°C selama 5 menit), (*annealing* 96°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit), (ekstension 72°C selama 3 menit dan *final extension* 72°C selama 7 menit). Produk PCR dianalisa pada gel agarose 1% dan divisualisasi dengan *ultraviolet illumination* setelah ditambah etidium bromida 5 µl. Band DNA yang diperoleh pada agar dipotong dan dipurifikasi dengan Promega Kit Protokol (Jamsari, 2007).

#### **3.2.5.3. Gel elektroforesis.**

3 µl DNA setelah di PCR ditambah dengan 5 µl *loading dye buffer* dielektroforesis pada 100 Voltase selama 40 menit pada 1% agarose gel dalam 0.5 x TBE. Sebagai marker digunakan 1 kb DNA ladder (Takara). Gel kemudian diletakkan di dalam wadah ditambah lagi dengan TBE sampai terendam serta zat warna etidium bromida (5 µl) direndam sambil digoyang dengan alat penggoyangnya (Rocker, NB-104) selama 30 menit. Gel kemudian dilihat di bawah lampu UV (Kim dan Cho, 2010).

#### **3.2.5.4. Purifikasi DNA dengan Promega Kit Protocol**

Band DNA dipotong dari agarose gel, kemudian dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambah 300 µl *nuclease free water* terhadap volume gel, kemudian dicampur di waterbath pada 60°C selama 10 menit. Kemudian dimasukkan sampel pada kolom *QIAquick* dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 45 detik pada suhu ruang. Ditambahkan 700 µl *membrane wash solution* dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Setelah itu

ditambahkan lagi 700  $\mu$ l *membrane wash solution* dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang, kemudian dipindahkan ke kolom *QIAquick* pada 1,5 ml eppendorf, dan ditambahkan elusi (30  $\mu$ l *nuclease free water*) pada bagian tengah kolom *QIAquick*, kemudian ditunggu 1 menit dan dipindahkan ke dalam eppendorf baru dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit, disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kim dan Cho., 2010).

#### **3.2.5.5. Analisis data sekuensing**

Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *software DNA star*. Untuk analisa *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (*query*) dengan yang telah ada pada Gene Bank dengan database searches NCBI internet site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dengan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Kim dan Cho., 2010).

### **Percobaan Tahap 2 :**

#### **3.3. Uji Biologis Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap Kadar Kolesterol pada Daging Itik Pitalah.**

Percobaan tahap 2 ini dilakukan untuk mengevaluasi efek pemberian BAL dengan beberapa dosis pemberian sebagai probiotik pada itik Pitalah pedaging dan itik Pitalah petelur.

##### **3.3.1. Bahan dan Alat**

Ternak yang digunakan dalam penelitian ini adalah itik Pitalah jantan dan betina yang berumur 5 bulan diambil dari Pitalah Kecamatan Batipuh Baruh Kabupaten Tanah Datar. Bahan yang diperlukan pada uji biologis ini adalah, isolat BAL probiotik, , ransum (jagung tumbuk, dedak, buntel, kepala ikan (konsentrat),

turbo, top mix, mineral itik, daun keladi, pepaya dan singkong, ubi jalar (Tabel 2). Untuk menghitung dosis BAL sebagai probiotik dibutuhkan media MRS agar (Merck), MRS broth (Merck), akuabides (ddHO<sub>2</sub>), Pepton Water (Bacto). Bahan untuk uji kolesterol adalah alkohol p.a., Aseton p.a. dan kit kolesterol.

Tabel 2. Komposisi ransum ternak

No.	Ransum	%
1.	Jagung tumbuk	50 % dari total ransum
2.	Dedak	20 % dari total ransum
3.	Bunttil	25 % dari total ransum
4.	Kepala ikan	5-10 % dari total ransum
5.	Konsentrat	Sesuai anjuran
6.	Turbo	Sesuai anjuran
7.	Top mix	Sesuai anjuran
8.	Mineral itik	Sesuai anjuran
9.	Daun keladi, Singkong, pepaya, ubi jalar	Dicampur dalam makanan

Sumber : Laboratorium Nutrisi Ternak Fakultas Peternakan Univ. Andalas (2005)

Alat yang diperlukan kandang (Lampiran 5) ternak, yaitu bambu yang berukuran 1 x 0,5 m per unitnya, timbangan untuk menimbang ransum, tempat pakan itik dan tempat minum. Alat untuk menentukan kadar kolesterol telur itik: tabung reaksi, hot plate, inkubator dan *Spektrofotometer clinicol chemistry analyzer*, timbangan untuk menimbang ransum tempat pakan itik dan tempat minum. Alat yang digunakan untuk menghitung koloni bakteri: *Quebec Colony Counter*, autoklaf, *laminar air flow cabinet*.

### 3.3.2. Metoda Penelitian

Metoda penelitian ini merupakan metoda penelitian eksperimen. Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah dosis pemberian probiotik yaitu :

- Perlakuan A : Sebagai Kontrol (tanpa pemberian probiotik)  
Perlakuan B : Pemberian 1 ml probiotik ( $12.7 \times 10^8$  CFU/g)  
Perlakuan C : Pemberian 2 ml Probiotik ( $25.4 \times 10^8$  CFU/g)  
Perlakuan D : Pemberian 3 ml Probiotik ( $38.1 \times 10^8$  CFU/g)

Model matematis dari Rancangan ini adalah :

$$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai rata-rata sesungguhnya

$a_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$e_{ij}$  = Galat

$i$  = A, B, C, D, E (perlakuan)

$j$  = 1,2,3 (ulangan)

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam sesuai rancangan yang digunakan. Uji lanjut DMRT untuk semua perbedaan diantara perlakuan diuji pada tingkat 5%. Semua analisis yang dilakukan menggunakan prosedur Steel dan Torrie (1991).

Peubah yang diamati :

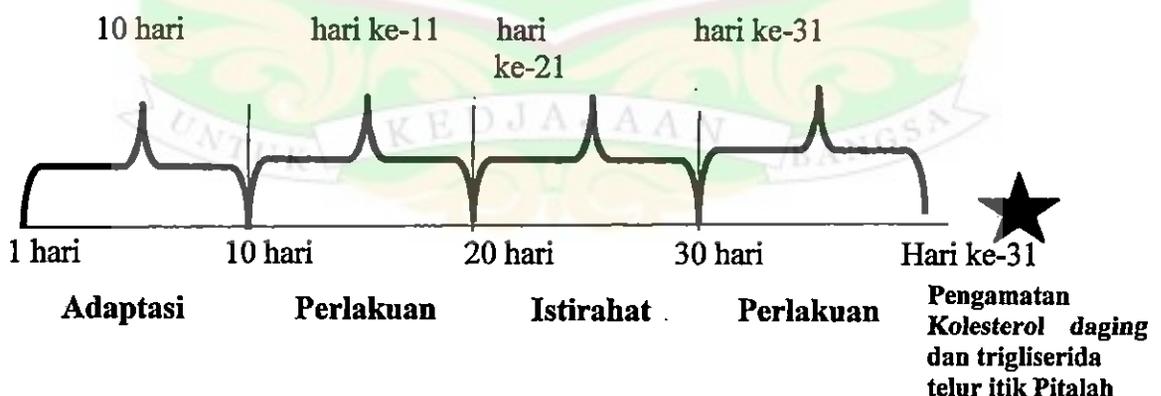
1. Kadar kolesterol pada daging itik Pitalah jantan
2. Kadar triserida pada telur itik Pitalah
3. Bobot badan itik Pitalah

### 3.3.3. Penghitungan Koloni BAL Digunakan untuk Probiotik Pada Itik Pitalah

Stok kultur (*glycerol stock*) BAL sebagai probiotik, ditumbuhkan dalam media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan metoda pengenceran (Purwati, 2003) (Lampiran 2). Setelah 24 jam koloni BAL probiotik yang tumbuh dihitung dengan menggunakan alat *Quebec Colony Counter* (*ColonyForming Unit*). Perhitungan total koloni bakteri adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{CFU/g} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{1}{\text{faktor berat sampel}} \\ \text{CFU/g} &= 127 \times \frac{1}{10^{-7}} \times \frac{1}{1\text{g}} \\ &= 12.7 \times 10^8 \text{ CPU/g} \end{aligned}$$

Selanjutnya diberikan kepada itik Pitalah jantan dan betina, pemberian probiotik dilakukan secara oral pada itik satu persatu sesuai dengan dosis perlakuan. Pemberian dilakukan 3 kali selang waktu sepuluh hari (selama 1 bulan). Pada hari ke-31 dilakukan pengamatan kolesterol daging yaitu pada itik jantan dan trigliserida pada telur itik Pitalah petelur (Gambar 5).



Gambar 5. Bagan penelitian uji biologis probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap kadar kolesterol daging dan kadar trigliserida telur itik Pitalah

### **3.3.4. Cara Ekstraksi Bahan Daging/Telur untuk Analisis Kadar Kolesterol dan Triglicerida (Protokol Analisis Kolesterol Laboratorium. Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas, 2011)**

Cara ekstraksi bahan daging dan telur untuk dianalisis kadar kolesterol dan triglicerida yaitu sampel (daging dan telur) diambil sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 10 ml aceton etanol. Pelarut aceton etanol dengan sampel diuapkan di dalam waterbath pada suhu 60° C sehingga volume pelarut separuh dari volume awal atau diuapkan selama 15 menit. Pelarut yang tinggal disaring dengan menggunakan kertas Whatman 41. Residu sampel dilarutkan kembali dengan aceton etanol sebanyak 5 ml, kemudian diuapkan kembali pada suhu 60° C selama 10 menit. Pelarut yang tersisa disaring dan diulang sekali lagi. Hasil ekstraksi dipanaskan di dalam waterbath pada suhu 60° C sehingga volume pelarut yang tertinggal 1 ml. Larutan ekstraksi ini kemudian dianalisis kadar kolesterol dan triglicerida dengan spektrofotometer..

#### **3.3.4.1. Analisis kolesterol dengan metode warna enzimatik (Plummer, 1978)**

Sebanyak 1 ml *working reagent* (kit) kolesterol dipipetkan ke dalam cuvet reaksi kemudian ditambahkan hasil ekstraksi sebanyak 0,01 ml (a). Larutan dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar sehingga warna larutan berubah menjadi warna lembayung (b). Pembuatan blanko: 1 ml kit kolesterol dipipet ke dalam tabung reaksi. Blanko dibuat sebagai pembanding. Setiap satu analisa dibuatkan satu seri blanko (c). Blanko dimasukkan ke dalam sel spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 550 nm, setelah angka dimonitor

menunjukkan angka 0 dimasukkan sampel yang akan dibaca. Kadar kolesterol merupakan angka yang terbaca di monitor spektrofotometer.

#### **3.3.4.2. Analisis trigliserida dengan metode warna enzimatik (SHM, 2000)**

Sebanyak 1 ml *working reagent* (kit) trigliserida dipipetkan ke dalam cuvet, kemudian ditambahkan hasil ekstraksi sebanyak 0,01 ml, kemudian diinkubasi selama 20 menit di dalam waterbath pada suhu 37 °C sehingga warna larutan berubah menjadi warna lembayung. Pembuatan blanko: 1 ml *working reagent* kit trigliserida dipipetkan ke dalam tabung reaksi. Blanko dibuat sebagai pembanding, setiap satu analisa dibuatkan satu seri blanko. Blanko dimasukkan ke dalam sel spektrofotometer setelah diarahkan pada panjang gelombang 520 nm, setelah angka dimonitor menunjukkan angka 0.

#### **3.3.5. Berat Badan (kg/ekor)**

Pengamatan berat badan ditimbang sebelum dan sesudah perlakuan yaitu sebelum perlakuan 10, 20, 30 hari perlakuan, dan diukur lagi pada hari ke-31. Data berat badan dianalisis secara statistik.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Penelitian Tahap I

Penelitian tahap I merupakan percobaan di Laboratorium Hasil Ternak Fakultas Peternakan, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang dan Laboratorium Bioteknologi Virulogi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia di Bogor, dengan tujuan mendapatkan Bakteri Asam Laktat (BAL) potensial yang berasal dari fermentasi biji kakao Sumatera Barat yang akan dijadikan kandidat probiotik untuk diuji pada penelitian Tahap II. Beberapa hasil penelitian dari tahap I dapat diuraikan sebagai berikut:

#### 4.1.1. Isolasi, Pemurnian, Karakterisasi Koloni BAL Konvensional

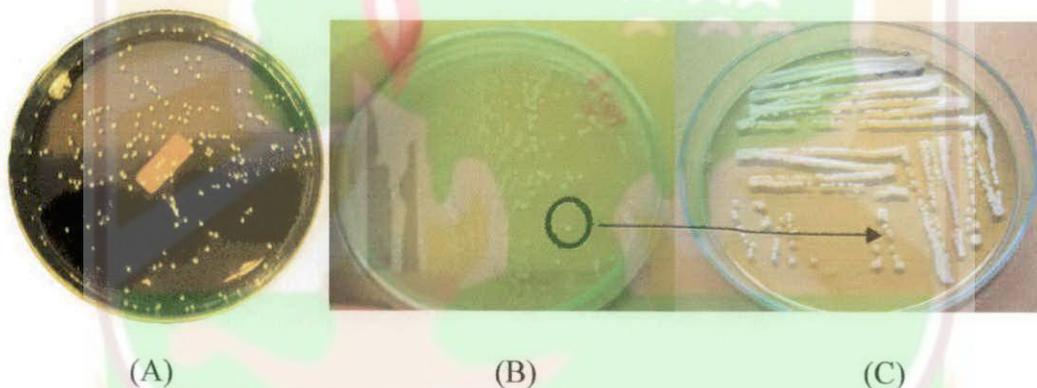
##### 4.1.1.1. Isolasi dan pemurnian koloni BAL

Bakteri Asam Laktat (BAL) pada penelitian ini adalah dari hasil isolasi biji kakao varietas *Criollo*, *Forestero* dan *Trinitario* yang difermentasi pada 2 dan 3 hari, sampel diambil di Pariaman, Sumatera Barat. Penelitian ini mengoleksi sebanyak 66 isolat bakteri (Tabel 3) yang diduga adalah sebagai BAL yang diisolasi pada media selektif yaitu MRSA (Merck).

Untuk mendapatkan isolat murni, 66 isolat BAL tersebut dilakukan penanaman ulang pada cawan petri berisi MRSA dengan *streak method* (Purwati 2006). Bakteri yang tumbuh dengan koloni tunggal, ditanam lagi pada media MRSA penanaman ulang dilakukan sebanyak tiga kali. Sekali dalam 1 minggu dilakukan peremajaan yang diisolasi pada media MRSB (Merck). Sebagai stok

isolat yaitu dengan menambahkan 50% gliserol steril pada media MRSB yang berisi kultur BAL kemudian disimpan pada  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Sebanyak 66 isolat BAL dinamakan menurut asal varietas biji kakao yang difermentasi, yaitu *Criollo/Green* (kakao varietas hijau), *Forestro/Red* (kakao varietas merah) dan *Trinitario/Hibrida* (kakao varietas hibrid), kemudian ditambah kode fermentasi hari ke-2 dan ke-3. Setelah isolasi dan pemurnian 66 koloni BAL dilanjutkan dengan uji karakterisasi koloni dan sel BAL secara konvensional. Pemurnian koloni dapat dilihat pada Gambar 6, Kode 66 isolat BAL dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 6. Foto koloni BAL (A dan B) dan pemurnian BAL (C)

Tabel 3. Kode 66 isolat BAL asal biji kakao varietas *Criollo*, *Forestero* dan *Trinitario* pada 2 dan 3 hari fermentasi

No	Kode Isolat	Sumber
1	Gr2 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Criollo</i> (Green) Fermentasi 2 Hari
2	Gr3 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Criollo</i> (Green) Fermentasi 3 Hari
3	R2 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Forestero</i> (Red) Fermentasi 2 Hari
4	R3 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Forestero</i> (Red) Fermentasi 3 Hari
5	Hb2 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Trinitario</i> (Hibrida) Fermentasi 2 Hari
6	Hb3 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11)	Varietas <i>Trinitario</i> (Hibrida) Fermentasi 3 Hari

#### 4.1.1.2. Karakterisasi koloni dan sel BAL konvensional

Pengamatan karakteristik koloni BAL dilakukan setelah isolat ditumbuhkan pada media MRSA yang diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 48 jam, sebelumnya untuk pengamatan karakteristik sel BAL, dilakukan setelah kultur diinkubasi selama 14 jam - 17 jam. Hasil pengamatan karakteristik koloni dan pewarnaan Gram BAL dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik morfologi koloni, sel dan pengujian gram

Kode Isolat	Isolat Bakteri Asam Laktat						
	Koloni					Pewarnaan Gram	
	Warna	Bentuk	Ukuran	Pinggir	Permukaan	Bentuk	Gram
Gr2.3	Putih-krem	Bulat	Besar	Rata,halus	Cembung	Batang	+
Gr3.7	Putih-krem	Bulat	Kecil	Rata,halus	Cembung	Kokus	+
R2.4	Putih-krem	Bulat	Besar	Rata,halus	Cembung	Kokus	+
Hb2.11	Putih-krem	Bulat	Besar	Rata,halus	Cembung	Kokus	+
Hb3.3	Putih-krem	Bulat	Besar	Rata,halus	Cembung	Kokus	+

Tabel 4 menunjukkan bahwa, kelima isolat bakteri tersebut menunjukkan karakteristik sebagai BAL. Isolat Gr3.2 memiliki sel berbentuk batang (Gambar 7), sedangkan 4 lainnya semua berbentuk kokus (Gambar 7B), tetapi karakteristik koloni dan pengujian gram semuanya sama yaitu menunjukkan bakteri gram positif, karena selnya memperlihatkan warna ungu tua. Pernyataan ini ditunjang oleh pendapat Bergey dan David (1994), Purwati (2003) dan Unus (2005), pewarnaan gram atau metode gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang paling penting yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Dalam proses ini, olesan bakteri yang sudah terfiksasi dikenai larutan-larutan berikut : zat pewarna kristal violet, larutan yodium, larutan alkohol, dan zat pewarna tandingannya berupa zat warna

safranin. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yaitu bakteri yang terwarnai dengan metode ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif akan mempertahankan zat pewarna kristal violet dan karenanya akan tampak berwarna ungu tua di bawah mikroskop, adapun bakteri gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi zat pewarna tandingannya yaitu dengan zat pewarna safranin akan tampak berwarna merah. Perbedaan warna ini disebabkan oleh perbedaan dalam struktur kimiawi dinding selnya.



Gambar 7. Pewarnaan gram positif dari BAL, BAL berbentuk batang (A), BAL bentuk kokus (B)

Karakteristik BAL yang ditemukan pada penelitian ini sama halnya dengan yang dideskripsikan oleh Purwati (2003) dan Unus (2005). Koloni BAL dengan ciri berbentuk bulat atau batang, permukaannya cembung, mengkilat, warna putih-krem seperti susu dengan pinggiran halus. Penelitian uji pewarnaan gram ini sama dengan yang ditemukan oleh Daniel *et al.* (2007), yaitu hasil isolasi dan identifikasi mikrobiologi BAL dari fermentasi daging, ditemukan BAL dengan bentuk kokus, kemudian hal yang sama dilakukan oleh Ham *et al.* (2010),

menemukan BAL berbentuk kokus dari fermentasi bawang putih. Selanjutnya Halami dan Prakash (2010), menemukan BAL berbentuk kokus pada produk fermentasi kacang-kacangan. Skotia (2010) menemukan BAL potensial asal bekasam ikan berbentuk batang. Beberapa penelitian diatas setelah uji pewarnaan Gram, ditemukan morfologi BAL berbentuk kokus dan batang dari berbagai sumber produk fermentasi, namun walaupun bentuk morfologi selnya sama akan tetapi jika dilakukan uji karakteristik dan potensi aktivitas antimikrobal akan ditemukan perbedaan. Jadi dari hasil uji karakterisasi koloni dan sel BAL konvensional, ditemukan koloni BAL dengan warna putih kekuningan, permukaan cembung, mengkilat, dengan pinggiran koloni rata dan halus. Sel BAL yang ditemukan berbentuk batang dan kokus.

#### **4.1.2. Seleksi Bakteri Asam Laktat Potensial Aktivitas Antimikrobal (Skrining BAL)**

Hasil seleksi 66 isolat BAL dengan kriteria memiliki diameter zona hambat yang paling tinggi terhadap pertumbuhan bakteri patogen (*Eschericia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Listeria monocytogenesis*, *Bacillus subtilis* NBRC 3134 dan *Salmonella typhi*), ditemukan 5 isolat yang memiliki aktivitas antimikrobal dengan zona hambat yang tinggi, isolat BAL pada uji skrining aktivitas antimikrobal ditumbuhkan pada media MRSB pada pH standar yaitu 6.8. Aktifitas antimikrobal 5 Isolat BAL terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Tabel 5.

Tujuan seleksi BAL terhadap aktivitas antimikrobal adalah untuk menyeleksi dan untuk mendapatkan BAL paling potensial yang akan dijadikan kandidat probiotik pada uji berikutnya. Pada Tabel 5 memperlihatkan bahwa,

hasil uji zona hambat 5 isolat BAL (Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3) terhadap bakteri patogen (*Escherichia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* NBRC 3134 dan *Salmonella typhii*), memperlihatkan diameter zona hambat yang sangat tinggi berkisar antara 25.00 mm sampai 32.50 mm melebihi kontrol yaitu antibiotik (*Penicillin*) yang hanya memiliki diameter zona hambat 22.50 mm.

Tabel 5. Aktifitas antimikrobia 5 isolat BAL terhadap bakteri patogen

No.	Bakteri patogen	Diameter Zona Hambat Isolat BAL (mm)				
		Gr2.3	Gr3.7	R2.4	Hb2.11	Hb3.3
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	25,0	25,0	30,0	27,5	30,0
2.	<i>Escherichia coli</i>	27,5	25,0	30,0	25,0	27,5
3.	<i>Listeria monocytogenes</i>	27,5	25,0	30,0	25,0	32,5
4.	<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0	25,0	27,5	27,5	32,5
5.	<i>Salmonella typhii</i>	27,5	27,5	27,5	27,5	32,5
6.	<i>Penicillin</i> (Kontrol +)	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5

Diantara 5 isolat BAL tersebut ditemukan isolat BAL Hb3.3 (asal kakao fermentasi 3 hari varietas *Trinitario*/hibrida) yang memiliki diameter zona hambat tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri patogen yaitu 27,5 mm terhadap *Escherichia coli* dan 32,5 mm terhadap 3 bakteri patogen lainnya yaitu (*Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella typhii*) dan 30,0 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134.

Diameter zona hambat tertinggi kedua adalah isolat R2.4 (asal kakao fermentasi 2 hari varietas *Forestero/Red*). Diameter zona hambat yang dimilikinya yaitu 27.5 mm terhadap *Salmonella typhii* dan *Staphylococcus aureus*

NBRC 13276 dan 30 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Escherichia coli* dan *Listeria monocytogenesis*.

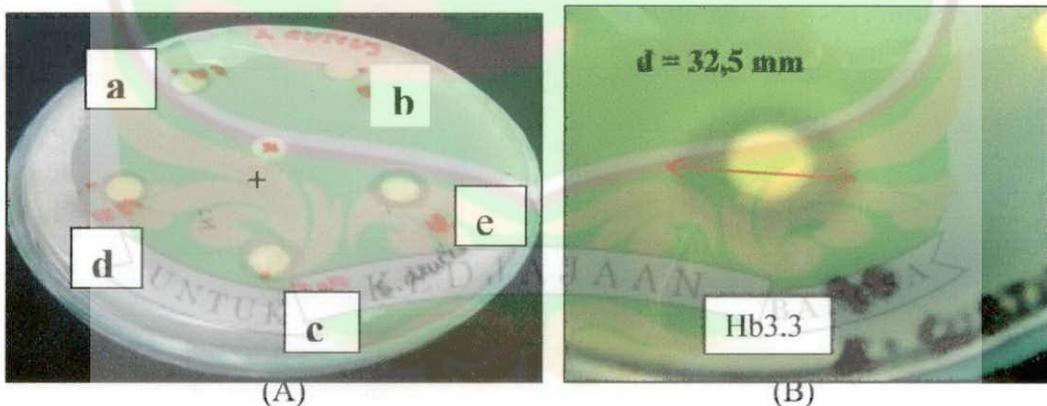
Isolat Gr2.3 dan Hb2.11 hampir memiliki potensi zona hambat yang sama. Isolat Gr2.3 (asal varietas *Criollo*/hijau fermentasi 2 hari) memiliki diameter zona hambat 25.0 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134 dan *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, 27.50 mm terhadap *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenesis* dan *Salmonella typhii*. Isolat Hb2.11 (asal varietas Trinitario/hibrida fermentasi 2 hari) memiliki zona hambat 25 mm terhadap *Escherichia coli* dan *Listeria monocytogenesis*, 27.5 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Salmonella typhii* dan *Staphylococcus aureus* NBRC 13276. Aktivitas antimikrobia 5 isolat BAL terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Gambar 8.

Besar atau kecilnya diameter zona hambat BAL terhadap bakteri patogen, dipengaruhi oleh produksi bakteriosin dan asam laktat yang dihasilkan BAL tersebut, dan masing-masing BAL memiliki zona hambat yang berbeda-beda tergantung karakteristik BAL itu sendiri. Sebagaimana yang dinyatakan oleh Lee, Hong, dan Chang (2002), salah satu indikator yang menunjukkan kemampuan BAL dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dapat dilihat dari luasnya zona bening yang dihasilkan ketika uji antimikroba. Luasnya zona bening/zona hambat berhubungan dengan kemampuan BAL dalam memproduksi metabolit sekunder yaitu asam laktat dan bakteriosin. Masing-masing BAL memiliki kemampuan yang berbeda dalam memproduksi bakteriosin dan asam laktat, tergantung karakteristik yang dimilikinya.

Hasil uji diameter zona hambat isolat Hb3.3 terhadap *Listeria monocytogenesis* yaitu 32.50 mm, hal yang sama telah dilakukan oleh Osmanagaoglu *et al.* (2001), BAL *Pediococcus pentosaceus* asal fermentasi daging memiliki diameter zona hambat 28.00 mm *Listeria monocytogenesis*.

Hasil diameter zona hambat Hb3.3 terhadap *Staphylococcus* dan *Escherichia* yaitu 32.50 mm dan 27.50 mm, zona hambat yang dimilikinya lebih besar dari penelitian Savadogo *et al.* (2004), hasil penelitiannya yaitu uji zona hambat isolat BAL terhadap *Staphylococcus* dan *Escherichia coli*, memiliki zona hambat 8.00 mm dan 12.00 mm

Diametear zona hambat isolat Hb3.3 terhadap *Salmonella typhii* memiliki zona hambat 32.50 mm, yaitu lebih besar zona yang dimilikinya dari penelitian Esayas *at al.* (2008), yang dengan hasil uji antimikrobal BAL asal susu fermentasi terhadap *Salmonella typhii*, memiliki diameter zona hambat yaitu 7.00 mm - 12 mm.



Gambar 8. Zona hambat 5 isolat BAL potensial terhadap bakteri patogen.  
Keterangan: (A) : isolat Hb2.11 (a ), isolat Gr3.7 (b), isolat R2.4 (c), isolat Gr2.3 (d), isolat Hb3.3 (e), kontrol positif (*Penicillin*), (B) : isolat Hb3.3

Jika dibandingkan dengan beberapa penelitian aktivitas zona hambat diatas, isolat BAL Hb3.3 asal fermentasi kakao Sumatera Barat dapat dijadikan sebagai

kandidat probiotik karena memiliki diameter zona hambat mencapai 32.50 mm terhadap 3 bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Listeria monocytogenesis* dan *Salmonella typhii*, 30.00 mm terhadap *Bacillus subtilis* NBRC 3134. Sesuai dengan pernyataan Purwati dan Syukur (2006), yaitu salah satu kriteria probiotik adalah memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi yang akan digunakan sebagai probiotik untuk manusia dan hewan, antibiotik alami di bidang kesehatan dan sebagai *food preservative* di bidang pangan.

Jadi dari uji aktivitas antimikrobal dapat disimpulkan, isolat BAL Hb3.3 kandidat probiotik ini memiliki potensi aktivitas antimikrobal terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhii* dan *Listeria monocytogenesis*, oleh karena itu dapat digunakan sebagai probiotik pada hewan dan manusia. Pada bidang kesehatan hewan misalnya, pada unggas BAL potensial dapat membunuh bakteri patogen yang terdapat di saluran pencernaan sehingga dapat menjaga keseimbangan mikroflora usus, menurunkan kolesterol yang akan menghasilkan produk peternakan yang berkualitas. BAL berpotensi terhadap kesehatan total manusia sebagai antibiotik alami seperti antidiare dan penyakit tifus, karena potensial menghambat *Escherichia coli* NBRC 14237 dan *Salmonella typhii*. Di bidang pangan juga dapat direkomendasikan sebagai bahan pengawet alami *food preservative*, karena sangat sensitif terhadap *Listeria monocytogenesis* (antilisteria). Sesuai dengan pernyataan Osmanagaoglu *et al.* (2001) dan Purwati (2003), *Listeria* adalah bakteri patogen yang sering merusak makanan *food born*.

### **4.1.3. Karakterisasi (Stabilitas pH, Stabilitas Suhu, *Optical Density*) Bakteriosin BAL Potensial sebagai Kandidat Probiotik**

#### **4.1.3.1. Stabilitas pH kultivasi BAL potensial Probiotik pada aktivitas bakteriosin**

Hasil seleksi BAL paling potensial pada uji antimikrobal terpilih isolat Hb3:3 sebagai kandidat probiotik karena memiliki zona hambat yang tertinggi. Setelah melalui 2 kali seleksi, isolat BAL sebagai kandidat probiotik ini akan diuji selanjutnya yaitu uji karakterisasi terhadap stabilitas pH. Tujuan uji karakterisasi stabilitas pH isolat BAL kandidat probiotik (Hb3.3) ini, adalah untuk mempelajari kemampuan aktivitas antimikrobal BAL probiotik (Hb3.3) pada berbagai pH (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 dan 6.5), yang akan diaplikasikan sebagai probiotik pada hewan percobaan pada penelitian tahap II. Hasil kultivasi probiotik Hb3.3 pada berbagai pH dapat dilihat pada Tabel 6.

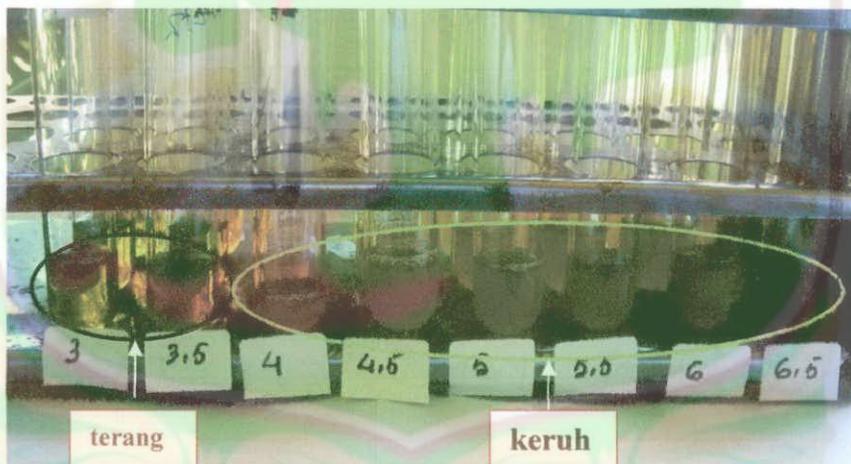
Hasil kultivasi isolat Hb3.3 pada berbagai pH pada media MRSB, memperlihatkan bahwa isolat Hb3.3 bisa tumbuh pada pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 dan pH 6.5 dengan ditandai kultur agak berwarna keruh pada pengamatan 24 jam. Pada pH 3.0 dan 3.5 media terlihat bersih (terang), artinya isolat BAL probiotik (Hb3.3) tidak bisa tumbuh atau tidak bertahan hidup pada suasana yang terlalu asam pada pengamatan sampai 24 jam. Kultivasi isolat Hb3.3 pada berbagai pH pada Media MRSB dapat dilihat pada Gambar 9.

Gambar 9, kultur probiotik Hb3.3 memperlihatkan warna keruh pada media MRSB pH 4 sampai 6.5 pada pengamatan 24 jam. Artinya isolat BAL Hb3.3 mampu tumbuh pada pH 4 sampai 6.5 sampai pengamatan 24 jam. Pada pH 3.0 dan 3.5 kultur berwarna coklat terang yaitu tidak menunjukkan adanya BAL yang tumbuh, artinya pada pH 3.0 dan 3.5 isolat Hb3.3 tidak mampu tumbuh.

Sesuai dengan penelitian Sahlin (1999), pada fermentasi kakao 24 sampai 36 jam memiliki pH sekitar 3 dan 3.5, dan pada pH ini yang tumbuh adalah *Acetobacteria* (Bakteri Asam Asetat).

Tabel 6. Kultivasi isolat Hb3.3 berbagai pH pada media MRS Broth (Merck)

No	pH	Hasil
1	3	- (bening)
2	3.5	- (bening)
3	4	+ (keruh)
4	4.5	+ (keruh)
5	5	+ (keruh)
6	5.5	+ (keruh)
7	6	+ (keruh)
8	6.5	+ (keruh)



Gambar 9. Kultivasi isolat Hb3.3 pada berbagai pH pada media MRS Broth

Hasil kultivasi isolat BAL probiotik (Hb3.3) pada pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6 kemudian diujikan terhadap aktifitas antimikrobal pada lima bakteri uji, hasil stabilitas berbagai pH BAL probiotik terhadap aktivitas antimikrobal dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Aktifitas antimikrobia isolat BAL probiotik (Hb3.3) yang dikultivasi pada berbagai pH

No	pH	Diameter Zona BAL terhadap Bakteri Patogen (mm)				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Listeria monocytogenesis</i>
1	4.0	20.0	28.0	27.5	20.0	22.5
2	4.5	20.0	17.5	25.0	20.0	22.5
3	5.0	20.0	22.5	20.0	20.0	22.5
4	5.5	20.0	22.5	20.0	20.0	22.5
5	6.0	20.0	32.5	27.5	20.0	22.5
6	6.5	20.0	32.5	27.5	20.0	22.5

Tabel 7 menunjukkan isolat BAL potensial (Hb3.3), pada aktivitas antimikrobia pada pH 4 sampai 6.5 tetap stabil dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan diameter berkisar dari 17.5 mm sampai 32.5 mm. Pada uji stabilitas pH isolat Hb3.3 selalu menunjukkan sensitif terhadap *Listeria monocytogenesis* dengan diameter hambat 22.5 mm, terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* stabil dengan diameter zona hambat 20.0 mm, sedangkan terhadap *Salmonella typhii* pada pH 4 diameternya yaitu 28.0 mm, pada pH 6 dan 6,5 diameternya mencapai 32.5 mm, terhadap *Staphylococcus aureus* pada pH 4 yaitu 27.5 mm, pada pH 4.5, 5, dan 5.5 diameter zona hambatnya 25.0 mm, 20.0 mm.

Ketika pH ditingkatkan menjadi 6.0 6.5 aktivitas antimikrobia meningkat dengan diameter zona hambat 27.5 mm. Jadi hasil uji stabilitas pH terhadap aktivitas antimikrobia dapat disimpulkan isolat Hb3.3 stabil pada pH 4.0 sampai 6.5, namun aktivitas antimikrobia sangat respons pada pH 6.5. Jika

dibandingkan uji stabilitas pH Hb3.3 yaitu pH 4 sampai dengan 6.5, tidak jauh berbeda dengan yang telah dilakukan oleh penelitian Rajaram *et al.* (2010), yaitu *Lactobacillus lactis* hanya stabil pada pH 6.0.

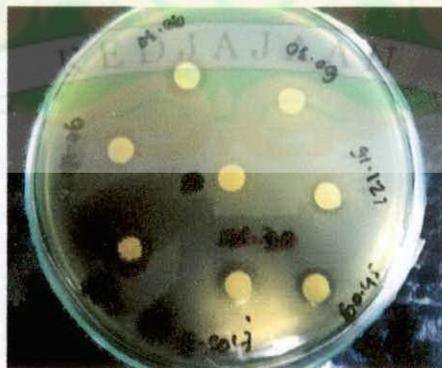
Beberapa penelitian terdahulu tentang uji stabilitas pH terhadap isolat BAL seperti Jamuna dan Jeevaratnam (2004), BAL dengan spesies *Pediococcus sp* memiliki aktivitas antimikrobia stabil pada pH 4.0 dan 5.0, sedangkan Esayas *et al.* (2008) menemukan, BAL *Pediococcus pentosaceus* asal susu fermentasi pada uji aktivitas antimikrobia stabil pada pH 2.0 sampai 12.0, dengan diameter zona hambat 2 mm sampai 10 mm. Selanjutnya Karthikeyan dan Santhosh (2009) menemukan *Lactobacillus acidophilus* asal usus udang laut stabil pada pH 5.0.

Jadi hasil uji stabilitas pH dan aktivitas antimikrobia isolat Hb3.3 dapat disimpulkan, isolat Hb3.3 memiliki toleransi pada pH 4.0 sampai 6.5, akan tetapi aktivitas antimikrobanya tinggi pada pH 6.5. Perbedaan atau persamaan karakteristik stabilitas pH BAL dipengaruhi oleh sumber BAL, lingkungan pH, suhu dan kadar karbohidrat yang terdapat pada media BAL. Sesuai dengan penjelasan Purwati *et al.* (2005), lingkungan pH, suhu, nutrisi, kadar karbohidrat (glukosa, fruktosa dan sukrosa) asal produk fermentasi (hewan atau tanaman), letak geografis menentukan karakter dan potensial dari BAL.

#### **4.1.3.2. Stabilitas suhu kultivasi BAL probiotik pada aktivitas bakteriosin**

Tujuan uji karakterisasi stabilitas suhu isolat BAL probiotik (Hb3.3) dan aktivitas antimikrobialnya adalah, untuk melihat potensi BAL probiotik (Hb3.3) pada berbagai suhu, sehingga dengan mengetahui kestabilan suhu dan aktivitas antimikrobialnya akan dapat diaplikasikan baik sebagai probiotik dan antibiotik alami pada hewan dan manusia maupun sebagai *food preservative* pada pangan.

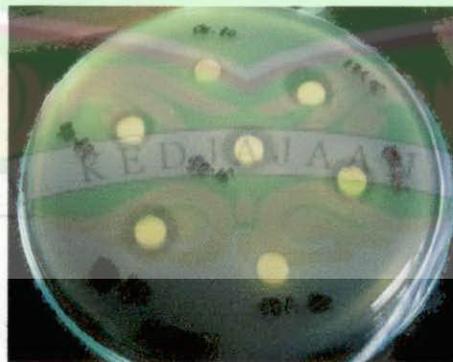
Hasil uji karakterisasi stabilitas suhu isolat BAL probiotik (Hb3.3) yang dikulturkan pada media MRSB pH 6.8, kemudian diinkubasi pada 45<sup>o</sup> C, 60<sup>o</sup> C, 75<sup>o</sup> C, 90<sup>o</sup> C, 100<sup>o</sup> C, 121<sup>o</sup> C, selama 30 menit, 45 menit dan 60 menit, kemudian diuji aktifitas antimikrobiaalnya terhadap 5 bakteri patogen, maka didapatkan hasil pada Tabel 8. Tabel 8 menunjukkan BAL potensial probiotik (Hb3.3) tetap stabil pada berbagai suhu (mulai 45<sup>o</sup> C, 60<sup>o</sup> C, 75<sup>o</sup> C, 90<sup>o</sup> C, 100<sup>o</sup> C sampai 121<sup>o</sup> C, selama 15 menit, 30 menit, 45 menit dan 60 menit) dan menunjukkan zona hambat yang tinggi terhadap 5 bakteri patogen. Diameter zona hambat yang dimilikinya berkisar 20.0 mm sampai 35.0 mm. Pemanasan supernatant isolat Hb3.3 pada suhu 121<sup>o</sup> C, selama 30 menit, 45 menit dan 60 menit khususnya pada *Listeria monocytogenesis* dan *Bacillus subtilis* memperlihatkan zona hambat yang sangat tinggi mencapai 35.0 mm (Gambar 10, 11, 12 dan 13). Suhu standar untuk kehidupan bakteri adalah suhu 37<sup>o</sup> C, akan tetapi pada probiotik isolat Hb3.3 ini ketika supernatant dipanasi mulai 45<sup>o</sup> C, 60<sup>o</sup> C, sampai 121<sup>o</sup> C menunjukkan aktivitas antimikrobiaalnya meningkat, dengan mengukur diameter zona hambat terhadap patogen.



Gambar 10. Aktifitas antimikrobial (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap *Escherichia coli* 48 jam pengamatan

Tabel 8. Aktifitas antimikrobal isolat Hb3.3 pada berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan pada pengamatan ke-48 jam

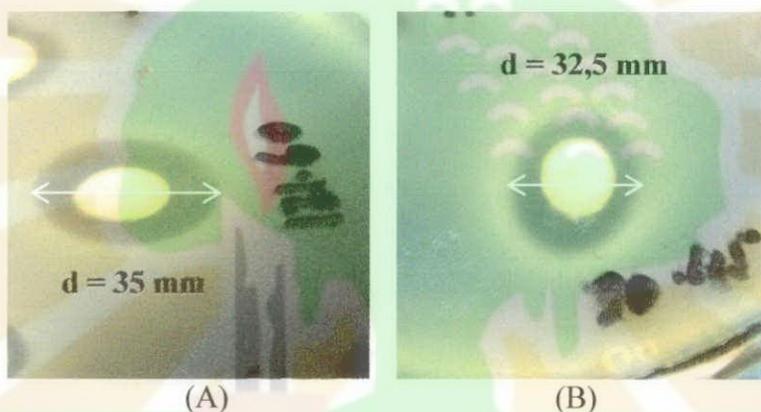
No	Suhu °C/menit	Bakteri Patogen (mm)				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhii</i>	<i>Staphilo-coccus aureus</i>	<i>Bacillus subtillis</i>	<i>Listeria monocyto-genesis</i>
1	Kontrol (37°C)	27.50	32.50	32.50	30.00	32.50
2	45/15	20.00	25.00	22.50	25.00	27.50
3	45/30	20.00	25.00	22.50	22.50	22.50
4	45/45	20.00	25.00	22.50	20.00	22.50
5	45/60	20.00	25.00	20.00	20.00	20.00
6	60/15	20.00	27.50	22.50	22.50	22.50
7	60/30	20.00	22.50	22.50	30.00	20.00
8	60/45	20.00	22.50	22.50	27.50	22.50
9	60/60	22.50	22.50	20.00	27.50	22.50
10	75/15	22.50	20.00	20.00	27.50	25.00
11	75/30	22.50	17.50	20.00	25.00	25.00
12	75/45	22.50	20.00	20.00	27.50	25.00
13	75/60	20.00	20.00	22.50	32.50	25.00
14	90/15	20.00	30.00	20.00	25.00	25.00
15	90/30	20.00	30.00	20.00	35.00	25.00
16	90/45	20.00	25.00	22.50	25.00	27.50
17	90/60	20.00	27.50	22.50	25.00	30.00
18	121/15	20.00	27.50	22.50	30.00	30.00
19	121/30	22.50	17.50	22.50	30.00	32.50
20	121/45	22.50	17.50	22.50	30.00	32.50
21	121/60	22.50	17.50	22.50	35.00	35.00



Gambar 11. Aktifitas antimikrobal (produksi bakteriosin) isolat Hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap *Salmonella typhii* 48 jam pengamatan



Gambar 12. Aktifitas antimikrobal isolat hb3.3, berbagai suhu pemanasan dan lamanya waktu pemanasan terhadap *Bacillus subtilis* 48 jam pengamatan



Gambar 13. Aktifitas antimikrobal isolat Hb3.3, berbagai suhu dan lamanya waktu pemanasan terhadap *Listeria monocytogenes* 48 jam pengamatan. (A) diameter zona hambat pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit, (B) diameter zona hambat pada Suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit

Pada Tabel 8. Uji stabilitas suhu dan aktivitas antimikrobal probiotik isolat Hb3.3 terhadap *Escherichia coli* pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  sampai  $121^{\circ}\text{C}$ , tetap stabil dengan diameter zona hambat 20.00 mm sampai 22.50 mm. Uji stabilitas suhu terhadap *Salmonella typhi* menunjukkan aktivitas antimikrobal stabil dari suhu  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  sampai  $75^{\circ}\text{C}$  yaitu zona hambat berkisar 20.00 mm, 22.00 mm dan 25.00 mm, ketika suhu ditingkatkan menjadi  $90^{\circ}\text{C}$  diameter zona hambat meningkat yaitu 30.00 mm. Selanjutnya ketika suhu dinaikan  $121^{\circ}\text{C}$  selama zona hambat turun menjadi 17.50 mm.

Uji stabilitas suhu isolat Hb3.3 ini terhadap *Staphylococcus aureus* mulai dari suhu 45<sup>o</sup> C sampai 121<sup>o</sup> C menunjukkan zona hambat berkisar antara 20.00 mm dan 22.50 mm. Uji stabilitas suhu ini berbeda terhadap *Bacillus subtilis* dan *Listeria monocytogenes*, semakin ditingkatkan suhu inkubasi, semakin tinggi zona hambatnya yaitu, pada *Bacillus subtilis* diameter zona hambat menjadi 35.00 mm pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 60 menit, begitu juga terhadap *Listeria monocytogenes* zona hambat meningkat seiring meningkatnya suhu inkubasi pada suhu 121<sup>o</sup> C mencapai zona hambat 35,00 mm.

Uji stabilitas suhu pada penelitian ini sama hasilnya yang ditemukan oleh Halami dan Prakash (2010), *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 dari kacang-kacangan, memiliki karakter *antilisteria*, stabil pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit, akan tetapi pada isolat Hb3.3 inkubasi tetap stabil selama 60 menit. Selanjutnya Mandal *et al.* (2011), *Pediococcus acidilactici* asal daging fermentasi stabil pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 20 menit. Probiotik ini direkomendasikan sebagai bahan pengawet pada produk olahan daging.

Penelitian tentang uji stabilitas suhu dan aktivitas antimikrobia pada probiotik Hb3.3 ini berbeda dengan hasil penelitian Reenen, Dicks dan Chikindas (1998), *Lactobacillus plantarum* asal fermentasi biji gandum, hanya stabil sampai suhu 80<sup>o</sup> C. Setelah itu Osmanagaoglu, Beyatu dan Gunduz (2001) melakukan uji stabilitas suhu terhadap *Pediococcus pentosaceus* asal daging fermentasi, BAL bisa tumbuh pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit, akan tetapi diameter zona hambat hanya 12 mm terhadap *Listeria*, sedangkan pada penelitian ini terhadap *Listeria* mencapai 35 mm pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 60 menit. Setelah itu Joshi *et al.* (2006), *Lactobacillus sp* asal fermentasi buah-buahan, hanya stabil pada suhu

68<sup>o</sup> C dan direkomendasikan sebagai probiotik dan bahan pengawet buah-buahan (*Biopreservative Fruit Product*).

Jika dibandingkan dengan 5 hasil penelitian tersebut dengan hasil uji stabilitas suhu pada BAL potensial probiotik (Hb3.3), ternyata isolat Hb3.3 memiliki potensi yang lebih tinggi, yang pertama ditinjau dari segi diameter zona hambat terhadap bakteri patogen. Isolat Hb3.3 memiliki keunggulan, diameter zona hambat mencapai 35.00 mm. Review dari hasil penelitian BAL, terhadap stabilitas suhu, ternyata BAL Hb3.3 tetap potensial pada suhu tinggi, yaitu pemanasan mencapai 121<sup>o</sup> C selama 60 menit, masih memperlihatkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu 35.00 mm, oleh karena itu isolat BAL potensial Hb3.3 dapat direkomendasikan sebagai kandidat probiotik. Sesuai dengan penjelasan Daniel *et al.* (2007), BAL yang sensitif terhadap *Listeria* (bakteri patogen perusak makanan), dan stabil pada suhu tinggi diatas 100<sup>o</sup> C adalah probiotik yang dapat dijadikan bahan pengawet alami/*food biopreservative* pada industri makanan dan memiliki nilai jual yang tinggi, seperti pada olahan daging, ikan, sosis, bakso, susu dan *edible film* (bahan pelapis yang dapat dimakan) pada buah-buahan. .

#### **4.1.3.3. Tingkat Kekeruhan (Optikal Densiti) BAL Probiotik (Hb3.3)**

Hasil uji tingkat kekeruhan/OD (Optikal Densiti) isolat Hb3.3 selama pengamatan 28 jam dengan Spektrofotometer ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) bertujuan untuk melihat laju pertumbuhan isolat Hb3.3 probiotik potensial. Pengukuran dilakukan dengan tiga ulangan. Untuk melihat kekeruhan kultivasi isolat Hb3.3 dapat dilihat pada Tabel 9 dan Gambar 14.

Tabel 9 dan Gambar 14 menunjukkan bahwa, Fase pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) Hb3.3 terdiri dari fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase lag bakteri melakukan proses aklimatisasi terhadap kondisi lingkungannya (seperti pH, suhu, nutrisi dan lain sebagainya), pada fase ini peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat. Pada fase lag pada BAL potensial Hb3.3 terjadi selama jam ke-0 sampai jam ke-3. Fase kedua adalah fase eksponensial yang merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat. Pada pertumbuhan isolat BAL Hb3.3 pada fase eksponensial terjadi pada jam ke-4 sampai jam ke-14. Fase berikutnya adalah fase stasioner, pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada pertumbuhan BAL isolat Hb3.3 fase stasioner ini terjadi mulai jam ke-16 hingga jam ke-18. Fase terakhir adalah fase kematian, fase kematian pada pertumbuhan BAL Hb3.3 terjadi mulai jam ke-20 pada fase ini jumlah sel bakteri mulai menurun karena nutrisi dalam media dan cadangan energi dalam sel mulai menipis.

Bakteriosin merupakan substansi antibakteri yang disintesis langsung di ribosom selama pertumbuhan bakteri asam laktat, produksi maksimum terjadi pada fase eksponensial sampai awal fase stasioner. Tujuan uji OD Menurut Jimenez Diaz (1993) produksi bakteriosin terbaik pada saat mencapai akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner. Husmaini (2012), menyatakan Jika dibandingkan saluran pencernaan manusia dengan hewan yang telah didomestika seperti babi dan ternak peliharaan lainnya, maka ayam mempunyai saluran pencernaan yang lebih pendek, sehingga waktu yang diperlukan untuk proses pencernaan lebih singkat. Menurut Duke, Bird, Daniels dan Bertry (1981)

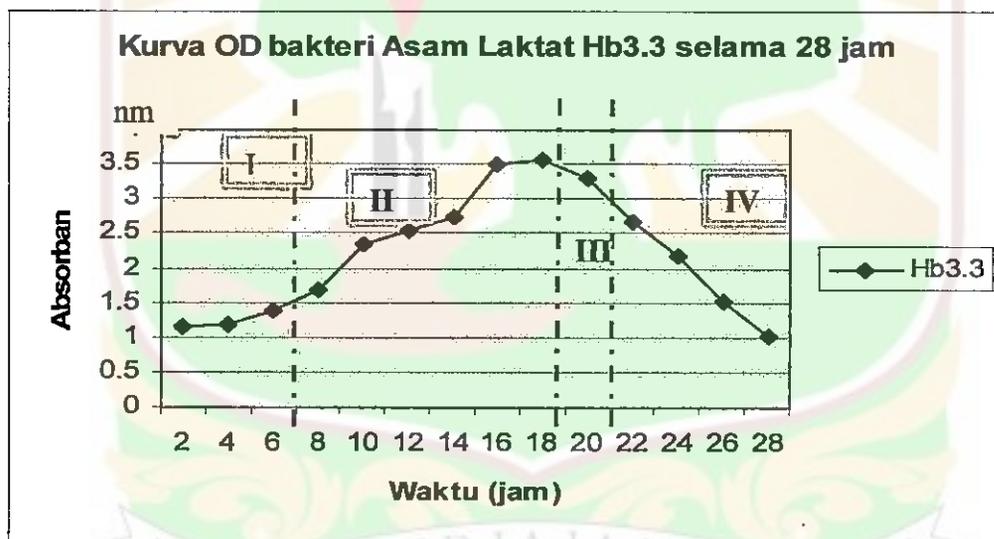
dalam Husmaini (2012), waktu yang diperlukan bahan makanan untuk sampai di usus adalah sekitar 2.5 jam. Menurut Ouwehand *et al.*(1999), mikroorganisme probiotik harus dapat mencapai saluran pencernaan (usus) dan tetap hidup dengan baik selama 4 jam atau lebih.

Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri merupakan metabolit sekunder yang disintesis selama fase stasioner dalam pertumbuhan bakteri. Bakteriosin merupakan antibakteri yang diproduksi mengikuti pola metabolit primer. Navaro *et al.* (2000) menjelaskan, bakteriosin diproduksi selama fase stasioner dalam pertumbuhan BAL seperti *Plantaricin F*, *Pediocin N5p*, *Plantaricin*. Pada produksi bakteriosin *Pediocin* disintesis selama fase eksponensial dan dicapai produksi maksimum pada fase stasioner.

Mengetahui uji optikal densiti adalah untuk mengetahui fase produksi optimum, dan fase kematian dari BAL Hb3.3. Mengetahui fase produksi dan fase kematian berguna saat penggunaan pada hewan dan manusia, oleh karena itu dapat diatur pemakaiannya. waktu yang diperlukan untuk proses pencernaan lebih singkat, maka pengaturan dan pengaruh pemakaian probiotik juga mempengaruhi khasiat yang diharapkan. Menurut Duke (1977) dalam Husmaini (2012), waktu yang diperlukan bahan makanan untuk sampai di usus adalah sekitar 2.5 jam.

Tabel 9. Tingkat kekeruhan (Optikal densiti) BAL probiotik (Hb3.3)

No	Waktu Inkubasi (jam)	Kekeruhan (Optikal Densiti) (nm)
1	2	1,3
2	4	1,3
3	6	1,4
4	8	1,7
5	10	2,3
6	12	2,5
7	14	2,7
8	16	3,5
9	18	3,5
10	20	3,2
11	22	2,6
12	24	2,2
13	26	1,5
14	28	1



I : Fase lag, II : Fase eksponensial, III : Fase Stasioner, IV : Fase kematian

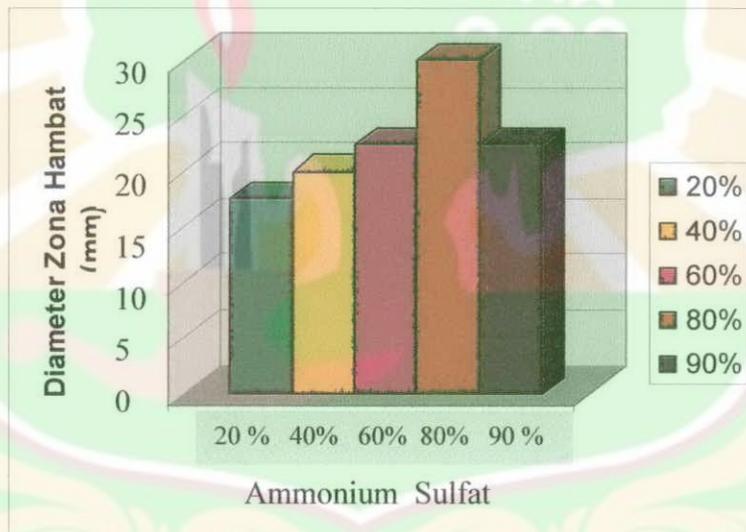
Gambar 14. Kurva OD (Optikal Densiti) bakteri asam laktat Hb3.3 selama 28 jam,

Hasil penelitin uji optikal densiti pada fase aksponensial isolat BAL Hb3.3 hampir sama dengan penemuan Skotia (2010), kurva OD *Lactobacillus plantarum* asal bekasam daging, dihasilkan fase eksponensial pada 7 jam, sedangkan isolate Hb3.3 pada 7 jam, tapi beda dengan fase stasioner pada 24 jam,

sedangkan isolat Hb3.3 mulai 16 jam. Sesuai dengan pernyataan Usmiati dan Marwati (2007), fase eksponensial umumnya beberapa BAL terjadi pada jam ke-7 dan mengalami fase stasioner setelah jam ke-20.

#### 4.1.4. Purifikasi Parsial Bakteriosin Isolat BAL Probiotik dan Pengukuran Aktivitas Inhibisi Bakteriosin

Hasil purifikasi parsial dengan presipitasi 20%, 40%, 60%, 60%, 80% dan 90% ammonium sulfat dan uji aktifitas antimikrobal terhadap isolat BAL probiotik Hb3.3, menunjukkan purifikasi parsial pada presipitasi 80% ammonium sulfat memperlihatkan aktifitas antimikrobal yang tertinggi, yaitu dengan diameter zona hambat 30.00 mm terhadap bakteri patogen (Gambar 15).



Gambar 15. Aktifitas antimikrobal dari bakteriosin yang dihasilkan isolat Hb3.3 dengan beberapa presipitasi ammonium sulfat terhadap *listeria monocytogenes*

Dapat diartikan presipitasi 80% ammonium sulfat adalah tingkat kejenuhan yang cocok untuk dapat mengendapkan bakteriosin Hb3.3 sehingga didapatkan aktifitas antimikrobal yang paling tinggi yaitu 30 mm. Diduga pada presipitasi 20%, 40%, 60% ammonium sulfat belum sempurna dapat

mengendapkan bakteriosin, sehingga aktifitas antimikrobialnya masih rendah yaitu dengan diameter zona hambat 17.50 mm, 20.00 mm dan 22.50 mm.

Ketika ditingkatkan persentase ammonium sulfat menjadi 90%, aktifitas antimikrobialnya menjadi turun yaitu diameter zona hambat 22.5 mm. Presipitasi 90% ammonium sulfat menyebabkan pengendapan protein bakteriosin menurun. Menurut Sambrook, Fritsch, dan Maniatis (1989), penambahan ammonium sulfat sebagai garam dalam tingkat kejenuhan tertentu dapat mengendapkan protein tertentu. Beberapa bakteriosin dapat diendapkan dengan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang rendah yaitu 20%, 30% 40% dan 50%. Ada pula bakteriosin hanya dapat diendapkan dengan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan yang tinggi, sehingga diperlukan presipitasi amonium sulfat dengan beberapa rentang tingkat kejenuhan yaitu presipitasi amonium sulfat 60%, 70%, 80%, dan 90%.

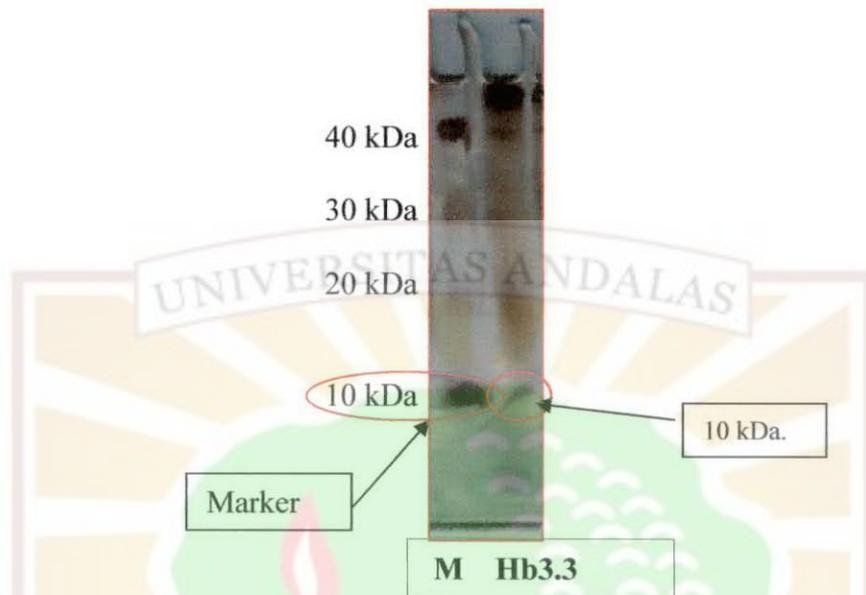
Hasil uji presipitasi ammonium sulfat pada penelitian ini sama dengan penelitian Rajaram *et al.* (2010), *Lactobacillus lactis* ditemukan memiliki aktifitas antimikroba maksimal yaitu pada presipitasi ammonium sulfat 80%, sama halnya yang ditemukan pada purifikasi BAL isolat Hb3.3. Begitu juga dengan penelitian Skotia (2010), menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* memiliki aktifitas antimikrobialnya pada presipitasi ammonium sulfat 80%, akan tetapi berbeda dengan penelitian Lozano *et al.* (1990), purifikasi parsial terhadap *Pediococcus acidilactici*, ditemukan aktifitas maksimal pada presipitasi ammonium sulfat 40%. hasil penelitian Joshi *et al.* (2006), purifikasi parsial *Lactobacillus sp.* ditemukan aktifitas maksimal pada presipitasi ammonium sulfat 20%-30%. Dapat diartikan bahwa, masing-masing BAL akan memiliki

karakteristik yang berbeda, tergantung senyawa bobot bakteriosin/peptida yang dimilikinya, kestabilan bakteriosin terhadap pH dan suhu, tergantung produksi asam laktat yang dihasilkan. Karakteristik BAL tersebut tidak terlepas dari asal produk, lingkungan (pH, suhu dan temperatur). Sesuai dengan pernyataan Nur (2005) dan Syukur (2011) perbedaan strain BAL, asal produk BAL (tanaman atau hewan), lingkungan (pH, suhu), kadar glukosa, fruktosa dan sukrosa, letak geografis menentukan karakteristik suatu BAL.

#### **4.1.4.1. Uji determinasi bobot molekul protein bakteriosin BAL probiotik dengan metoda *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE)**

Hasil purifikasi parsial isolat BAL potensial Hb3.3 dengan presipitasi ammoniumsulfat 80% (yang memiliki zona hambat paling tinggi terhadap uji antimikrobia), hasil presipitasi tersebut, kemudian diuji bobot molekul proteinnya dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE), hasil determinasi bobot molekul protein pada presipitasi 80% dapat dilihat pada Gambar 16.

Gambar 16 memperlihatkan bahwa, isolat Hb3.3 pada purifikasi parsial presipitasi ammonium sulfat 80% memiliki bobot molekul protein bakteriosin diperkirakan berkisar 10 kDa. Diduga pada presipitasi tersebut belum terpurifikasi sempurna, karena belum ditemukan satu fraksi yang jelas (sebelahan kanan marker).



Gambar 16. Bobot molekul bakteriosin isolat Hb3.3 dengan menggunakan SDS PAGE, M = Marker protein, Hb3.3= Isolat BAL potensial probiotik berasal dari kakao hibrida varietas *Trinitario* fermentasi 3 hari

Apabila dilanjutkan dengan fraksinasi dengan menggunakan kolom kromatografi kemungkinan akan didapatkan 1 garis fraksi yang jelas, yang menandai telah terjadi purifikasi, selanjutnya jika dideterminasi bobot molekul protein bakteriosin dari 1 fraksi hasil kolom kromatografi tersebut, diduga akan mendapatkan bobot molekul protein yang lebih kecil lagi sekitar 5 kDa. Sesuai dengan pernyataan Serkedjieva *et al.* (2000), untuk mendapatkan bobot molekul protein bakteriosin murni satu fraksi dibutuhkan 2 tahap perlakuan. Tahap pertama dinamakan purifikasi parsial, dimana purifikasi parsial ini adalah dengan presipitasi (pengendapan) pada berbagai konsentrasi ammonium sulfat, sedangkan untuk mendapatkan bakteriosin dengan satu fraksi murni, harus melalui tahap pemurnian berikutnya yaitu fraksinasi kolom kromatografi dengan berbagai fase diam dan eluen.

Hasil penelitian uji determinasi bobot peptida bakteriosin Hb3.3 setelah dipurifikasi parsial sama dengan yang ditemukan Ivanova *et al.* (2000), yaitu *Lactococcus lactis* dihasilkan bobot molekul peptida berkisar antara 10 kDa. Mandal *et al.* (2001) telah menemukan bobot molekul protein dari *Pediococcus acidilactici* berkisar antara 10.3 kDa, tidak terlalu jauh perbedaannya dengan hasil yang didapatkan pada isolat Hb3.3 yaitu dengan bobot molekul protein berkisar 10 kDa. Adanya persamaan bobot molekul protein ini disebabkan oleh karakter bakteriosin yang dimiliki oleh BAL tersebut. Masing-masing BAL memiliki karakter bobot molekul protein, ada BAL yang memiliki bobot molekul protein kecil yaitu  $\leq 5$  kDa yang digolongkan dengan bakteriosin golongan I, ada juga BAL yang memiliki bobot molekul  $\leq 10$  kDa, yaitu digolongkan kepada bakteriosin golongan II. Bakteriosin golongan II ini biasanya stabil pada suhu tinggi (*thermostable*).

Ada beberapa penelitian bakteriosin BAL, ditemukan bobot molekul protein lebih kecil dari 10 kDa karena telah melakukan 2 tahapan. Pertama parsial purifikasi (presipitasi ammonium sulfat), tahapan kedua dengan fraksinasi kolom kromatografi. Diantara hasil penelitian tersebut adalah Osmanagaoglu *et al.* (1998) hasil purifikasi dan karakterisasi *Pediocin* oleh *Pediococcus acidilactici* bobot molekul proteinnya berkisar 4.46 kDa. Dicks dan Chikindas (1998) melakukan purifikasi dan karakterisasi terhadap *Lactobacillus plantarum*, didapatkan bobot molekul protein berkisar 3.5 kDa. Selanjutnya Jamuna dan Jeevaratnam (2004) melakukan purifikasi dan melakukan uji determinasi terhadap isolat BAL potensial, didapatkan bobot molekul protein berkisar 3.5 – 5.0 kDa. Sahar *et al.* (2005) telah melakukan purifikasi dan karakterisasi terhadap

*Lactobacillus acidophilus*, didapatkan bobot molekul protein berkisar 6.6 kDa. Karthikeyan dan Santosh (2009) melakukan purifikasi terhadap *Lactobacillus acidophilus*, dan memiliki bobot molekul protein 2.5 kDa. Jadi diduga jika bakteriosin BAL Hb3.3 dilakukan purifikasi tahapan kedua yaitu dengan fraksinasi kolom kromatografi akan didapatkan bobot protein yang lebih kecil dari 10 kDa.

Ditemukan juga beberapa bobot molekul protein yang lebih dari besar dari 10 kDa, yaitu pada penelitian Andrea dan Denis (1994), hasil purifikasi parsial dan uji bakteriosin terhadap *Pediococcus pentosaceus* FBB61, didapatkan bobot molekul protein berkisar 80 kDa, selanjutnya Chien *et al.* (2004), menemukan bobot molekul protein *Pediococcus pentosaceus* ACCEL, yaitu 17.5 kDa.

Besar atau kecilnya bobot molekul protein bakteriosin BAL tergantung pada karakteristik bakteriosin dari BAL itu sendiri. Sesuai dengan pendapat Surono (2004), bakteriosin diklasifikasikan menjadi tiga grup yaitu bakteriosin kelas satu, bakteriosin kelas 2, serta bakteriosin kelas 3. Masing-masing kelas memiliki ciri-ciri yang berbeda. Bakteriosin kelas I merupakan bakteriosin yang terdiri atas satu atau dua peptida kecil dan merupakan peptida yang termodifikasi pada post-translasi, ukuran peptida ini sekitar 3 kDa. Bakteriosin ini juga disebut lantibiotik karena memiliki modifikasi struktur yang mengandung lanthionin,  $\beta$ -metillanthionin, dan asam amino terdehidrasi. Lantibiotik juga terbagi menjadi 2 subkelas yaitu tipe A dan tipe B. Lantibiotik tipe A yang telah banyak adalah nisin. Lantibiotik tipe A merupakan molekul yang fleksibel terelongasi dengan muatan positif serta memiliki aktivitas depolarisasi membran. Lantibiotik tipe B memiliki bentuk globular dan mengganggu sintesis dinding sel. Grup ke dua

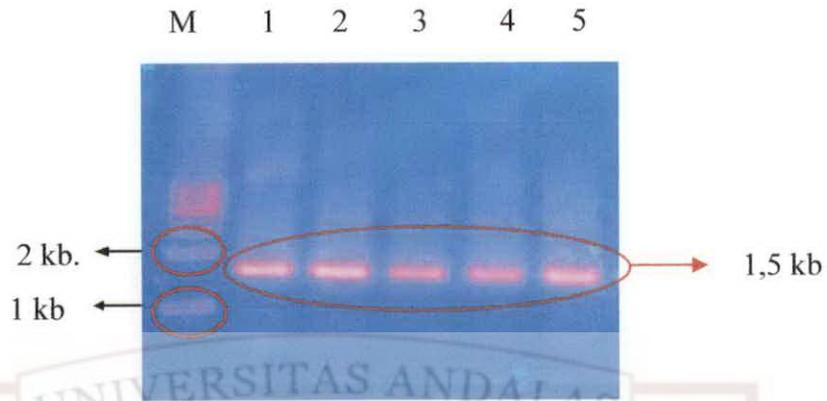
dalam bakteriosin adalah bakteriosin kelas 2. Bakteriosin kelas 2 memiliki ukuran yang kecil yaitu kurang dari 5 kDa dan terbagi menjadi 2 subkelas yaitu kelas Iia dan kelas Iib.

Hasil uji karakterisasi (stabilitas pH, suhu dan optikal density), purifikasi parsial dan determinasi bobot molekul protein bakteriosin dapat disimpulkan Hb3.3 dihasilkan stabil pada suhu tinggi (tahan panas), sensitif terhadap *Listeria*, dari bobot molekul protein bakteriosin dari isolat Hb3.3, yaitu tergolong bakteriosin yang memiliki berat molekul protein yang rendah, bakteriosin tahan panas, dan respon terhadap *Listeria* sehingga diduga bisa dikelompokkan pada golongan Lanthionin (bakteriosin kelas II). Sesuai dengan pendapat Leroy dan De Vuyst (2004), bakteriosin kelas II ini banyak digunakan pada pengolahan pangan untuk menghindari cacat produk, pada pangan fermentasi, *food aditif*, contoh dalam olahan sosis, bakso, ikan kaleng, sayur mayur, zaitun, dalam pembuatan keju dan susu.

#### **4.1.5. Identifikasi Lima Isolat Bakteri Asam Laktat**

##### **4.1.5.1. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Hasil isolat BAL potensial yaitu Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3 dapat dilihat pada Gambar 17. Gambar 17 memperlihatkan bahwa intensitas fragmen yang dihasilkan ke-lima isolat tersebut cukup tinggi, dan layak digunakan untuk kegiatan sekuensing pada tahap berikutnya. Hasil uji PCR terhadap lima isolat BAL asal fermentasi biji kakao, menunjukkan bahwa PCR sangat berpotensi digunakan untuk mendiagnosa jenis bakteri asam laktat yang berperan pada fermentasi biji kakao tersebut.



Gambar 17. Hasil uji PCR lima isolat BAL, (1) Gr2.3; (2) Gr3.7; (3) R2.4, (4) Hb2.11, (5) Hb3.3. tanda panah menunjukkan panjang pita (bp), Line M = DNA marker 1 kb (Takara)

Hasil isolasi DNA genomik digunakan pada amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR sebanyak 35 siklus. Dielektroforesis selama 40 menit 100 Volt pada gel dengan konsentrasi 1%. Hasil elektroforesis ini menunjukkan bahwa kegiatan PCR yang telah dilakukan berhasil mengamplifikasikan daerah gen 16S rRNA isolat Gr2.3, Gr3.7 R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3. Hal ini dapat dilihat oleh munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1.500 bp (1.5 kb) (Gambar 17) yang merupakan ukuran yang diharapkan jika menggunakan kombinasi primer GAGTTTGATCCTGGCTCAG untuk arah forward dengan primer AAGGAGGTGATCCAGCC untuk arah reverse.). Hasil elektroforesis ini menunjukkan munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1.500 bp (1.5 kb). Jamsari (2007) menyatakan, konfirmasi hasil PCR dengan analisis sekuensing menambah kepastian bahwa PCR dapat digunakan sebagai alat analisa yang akurat.

#### 4.1.5.2. Analisis BLAST Sekuen DNA

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan data sekuen yang dimiliki dengan sekuen-sekuen DNA dari berbagai penjuru dunia dari bakteri yang didepositkan pada database atau gen bank sekuen publik. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> didapatkan hasil pada sebagai berikut (Tabel 10).

Tabel 10. Hasil analisis BLAST sekuen DNA pada lima isolat BAL

Accession Number (Nomor Akses)	Isolat	Hasil Identifikasi	Max. Ident.
NC_014554.1	Gr2,3 (Varietas Criollo Fermentasi 2 hr)	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp	99 %
NC_008525.1	Gr3.7 (Varietas Criollo Fermentasi 3 hr)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	90 %
ACXB01000026.1	R2.4 (Varietas Forestero Fermentasi 2 hr)	<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4 cont1.26	98 %
NC_008525.1	Hb2.11 (Varietas Trinitario Fermentasi 2 hr)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	98 %
NC_008525.1	Hb3.3 (Varietas Trinitario Fermentasi 3 hr.)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	98 %

Hasil analisis BLAST sekuen DNA pada lima isolat BAL potensial didapatkan (Gr2.3, Gr3.7, R2.4, Hb2.11 dan Hb3.3) menunjukkan, isolat Gr2.3 memiliki kesamaan 99% dengan *Lactobacillus plantarum* subsp, isolat Gr3.7 memiliki kesamaan 90% dengan *Pediococcus pentosaceus*, Hb2.11 memiliki kesamaan 99% dengan *Pediococcus pentosaceus*, Hb3.3 memiliki kesamaan 98% dengan *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, sedangkan isolat R2.4 memiliki kesamaan 97% dengan *Pediococcus acidilactici* 7\_4 cont 1.26. Sebagai kandidat probiotik potensial adalah *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 dengan kode

isolat Hb3.3 (Lampiran 6). Sesuai dengan penjelasan Purwati dan Syukur (2006), tidak semua BAL dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik, hanya BAL yang memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi dan memiliki stabilitas pH dan suhu yang dapat digunakan sebagai probiotik.

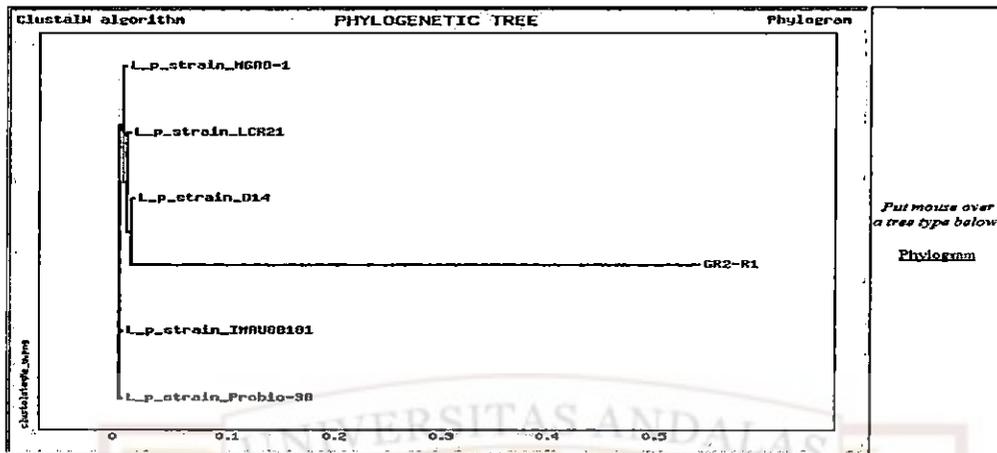
#### 4.1.5.3. Analisis sekuen Gen 16S rRNA isolat Gr2.3

Hasil sekuen DNA yang dilakukan secara satu arah menggunakan primer universal 1525R yang sama saat amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 589 bp. Urutan basa-basa tersebut dianalisis dengan data GenBank melalui program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat Gr2.3 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 99% dan nilai identifikasi 99% dengan berbagai strain *Lactobacillus plantarum* subsp, seperti yang terlihat pada Tabel 11. Setelah dianalisis menggunakan Klustal W (Gambar 18) memperlihatkan kesamaan dengan *Lactobacillus plantarum* MGA8-1. *Lactobacillus plantarum* termasuk *Lactobacillaceae* yang juga merupakan salah satu dari Bakteri Asam Laktat (BAL).

Tabel 11. Hasil analisis sekuen isolat Gr2.3 dengan menggunakan BLAST

Nomor (Accession Number)	Aksesi	Hasil BLAST	Query Coverage	Evalue	Max. Ident.
HMO57851.1		<i>Lactobacillus plantarum</i> MGA8-1	99%	0.0	99%
SHO259731.1		<i>Lactobacillus plantarum</i> LCR21	99%	0.0	99%
HO853454.1		<i>Lactobacillus plantarum</i> 014	99%	0.0	99%
GU3574991		<i>Lactobacillus plantarum</i> PROBIO-36	99%	0.0	99%



Gambar 18. Pohon filogenetik isolat Gr2.3 dengan Clustal W

Identifikasi molekular isolat Gr2.3 asal fermentasi kakao 2 hari varietas *Criollo* hasil BLAST memiliki kemiripan 99% dengan *Lactobacillus plantarum* subsp, spesies ini ditemukan juga oleh Lu, Breidt, Fleming, Altermann dan Klaenhammer (2003), *Lactobacillus plantarum* berasal dari acar timun. Emanuel Adrian, Ovidiu dan Câmpeanu (2005) menemukan *Lactobacillus plantarum* pada rumput makanan ternak. Skotia (2010) menemukan *Lactobacillus plantarum* asal bekasam ikan. Natalia dan Priadi (2008) menemukan *Lactobacillus sp* yang berasal dari sampel usus ayam. Artinya *Lactobacillus plantarum* dapat berasal dari sumber tanaman atau hewan.

Secara identifikasi molekular walaupun memiliki spesies yang sama namun karakteristiknya terdapat perbedaan. Sesuai dengan pendapat Ardhana dan Fleet (2003) dan Nur (2005), sumber isolat, lingkungan, suhu, pH dan kadar glukosa tempat tumbuh BAL mempengaruhi karakteristik suatu BAL.

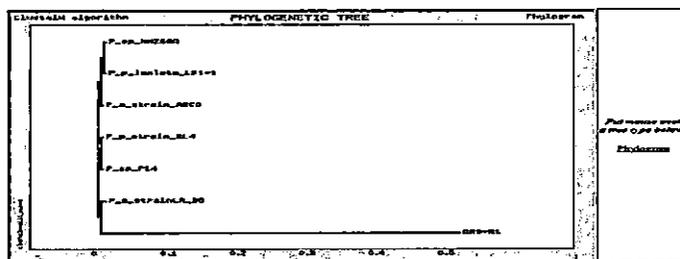
#### 4.1.5.4. Analisis sekuen Gen 16S rRNA isolat Gr3.7

Dari hasil sekuen DNA amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR pada isolat Gr3.7, didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 566 bp. Urutan basabasatersebut dianalisis dengan data GenBank melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat Gr3.7 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 88% dan nilai identifikasi 90% dengan berbagai strain *Pediococcus pentosaceus* seperti yang terlihat pada Tabel 12. Setelah dianalisis menggunakan clustal W memperlihatkan kesamaan dengan termasuk *Pediococcus pentosaceus* R-35 yang merupakan salah satu dari bakteri asam laktat (BAL).(Gambar 19). Hasil identifikasi molekular isolat Gr3.7. asal kakao fermentasi 3 hari varietas *Criollo*, BLAST menunjukkan memiliki kemiripan 90% dengan *Pediococcus pentosaceus*.

Tabel 12. Hasil analisis sekuen isolat Gr3.7 dengan menggunakan BLAST

Nomor Aksesori (Accession Number)	Hasil BLAST	Query coverage	Evalue	Max. Ident
F1611788.11	<i>Pediococcus pentosaceus</i> R-35	88%	0.0	90%
AY675243.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P14	88%	0.0	89%
EF141020.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> L14	88%	0.0	89%



Gambar 19. Pohon filogenetik isolat Gr3.7 dengan Clustal W

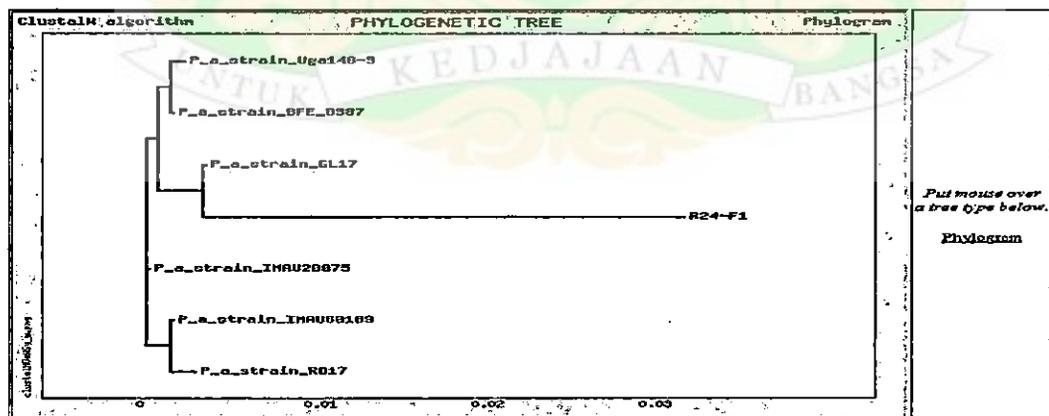
#### 4.1.5. 5. Analisis sekuen Gen 16S rRNA isolat R2.4

Dari hasil sekuen DNA amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR pada isolat R2.4, didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 1.111 bp. Urutan basa-basa tersebut dianalisis dengan data GenBank melalui program BLAST (*Basic Local alignment search Tool*).

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat R2.4 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 98% dan nilai identifikasi 90% dengan berbagai strain *Pediococcus acidilactici* 7\_4 cont. 1.26. Setelah dianalisis menggunakan clustal W memperlihatkan kesamaan dengan termasuk *Pediococcus acidilactici* GL17 yang merupakan salah satu dari BAL (Tabel 13 dan Gambar 20).

Tabel 13. Hasil analisis sekuen isolat R2.4 dengan menggunakan BLAST

Nomor Aksesori (Accession Number)	Hasil BLAST	Query coverage	Evalue	Max. Ident
GO421473.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> GL17	98%	0.0	97%
FJ844984.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> TMU20075	88%	0.0	89%
EU147310.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> BFE8387	98%	0.0	97%
FJ917739.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> TMU60189	98%	0.0	97%



Gambar 20. Pohon filogenetik isolat R2.4 dengan Clustal W

Identifikasi BAL yang berasal dari fermentasi 2 hari kakao asal Sumatera Barat varietas *Forestero/Red*, dihasilkan adalah *Pediococcus acidilactici*. sesuai dengan pernyataan Chafai *et al.*(2002), bahwa *Pediococcus acidilactici* merupakan BAL yang tahan terhadap pH rendah sehingga dapat mempertahankan mikroflora dalam saluran pencernaan, digunakan juga sebagai suplemen untuk meningkatkan imun dan kesehatan pada ayam broiler. Sebelumnya Barros, Carvalho, Peralta, Facklam dan Teixeira (2001) menyatakan probiotik bakteri yang menguntungkan bagi manusia yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui produksi asam laktat dan bakteriosin. Selanjutnya Dalloul *et al.* (2006), menyatakan bahwa *Pediococcus acidilactici* memiliki efek beracun terhadap bakteri patogen, sehingga digunakan sebagai obat alternatif pada ayam yang terinfeksi patogen tersebut. Lee *et al.* (2007) menyatakan, *Pediococcus acidilactici* digunakan juga sebagai modulator/pengatur kekebalan tubuh terhadap penyakit menular, seperti penyakit yang dialami oleh anjing yaitu *coccidiodal*.

Uji identifikasi molekular terhadap *Pediococcus acidilactici* ini juga telah ditemukan oleh Giancamillo, Vitari, Savoini, Bontempo, Bersani, Dell'Orto dan Domeneghini (2008), *Pediococcus acidilactici* berasal dari usus babi, Mandal *et al.* (2008) menemukan *Pediococcus acidilactici* berasal daging babi. Barreau, Thomas, Tompkins, Vanessa dan Carvalho (2012), *Pediococcus acidilactici* beraasal gulma (rumput pengganggu). Penelitian di atas menunjukkan *Pediococcus acidilactici* dapat berasal dari tanaman atau hewan. Menurut Okade (2003) dalam Husmaini (2012) BAL dapat diisolasi dari tanaman dan saluran pencernaan hewan atau produk yang berasal dari hewan, seperti susu fermentasi, akan tetapi karakteristik BAL yang berasal dari tanaman berbeda dengan BAL yang berasal

dari hewan, hal ini disebabkan pada tanaman banyak terdapat senyawa metabolit sekunder bioflavonoid yang dapat bersifat antioksidan. Kemampuan dari masing-masing BAL dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat juga berbeda, meskipun memiliki strain yang sama

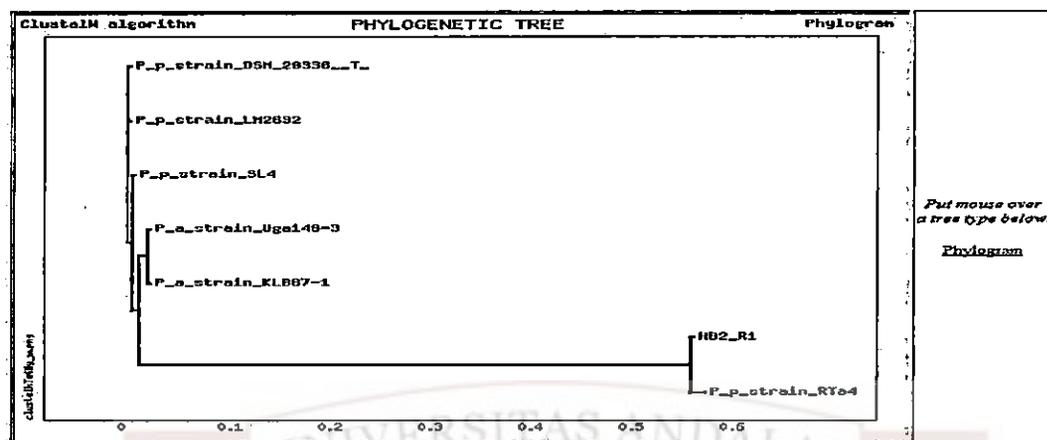
#### 4.1.5.6. Analisis sekuen gen 16S rRNA isolat Hb2.11

Dari hasil sekuen DNA amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR pada isolat Hb2.11, didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 1.111 bp. Urutan basa-basa tersebut dianalisis dengan data GenBank melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat Hb2.11 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 98% dan nilai identifikasi 98% dengan berbagai strain *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 seperti yang terlihat pada Tabel 13. Setelah dianalisis menggunakan Clustal W, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 memperlihatkan kesamaan dengan *Pediococcus pentosaceus* Rta4 yang merupakan salah satu dari bakteri asam laktat (BAL). (Tabel 14 dan Gambar 21).

Tabel 14. Hasil analisis sekuen isolat Hb2.11 dengan menggunakan BLAST

Nomor Aksesori (Accession Number)	Blast search result	Query coverage	Evalue	Max. Ident
FM179610.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> RTa4	98%	0.0	99%
FJ378890.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> B 38	98%	0.0	99%
HM1305360.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> -33	98%	0.0	98%
GO465207.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> HS-2	98%	0.0	98%



Gambar 21. Pohon filogenetik isolat Hb2.11 dengan Clustal W

#### 4.1.5.7. Analisis sekuen Gen 16S rRNA isolat Hb3.3

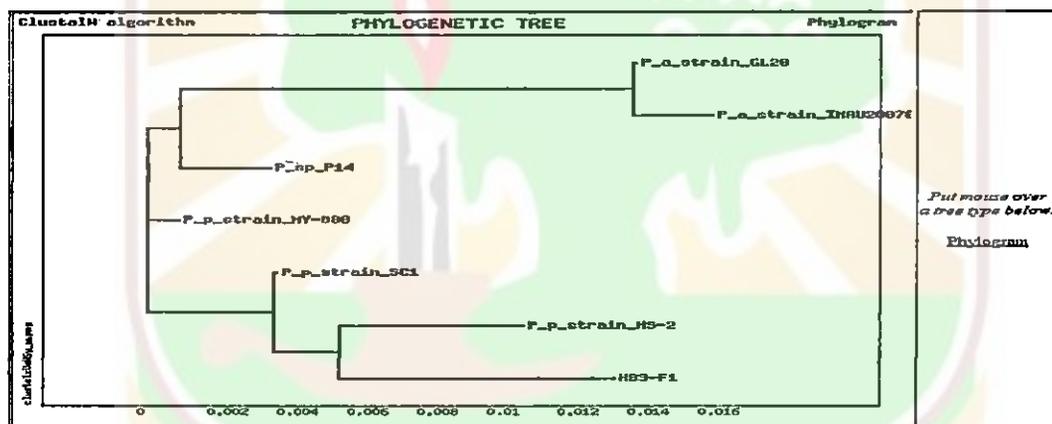
Dari hasil sekuen DNA amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR pada isolat Hb3.3 didapatkan sekuen basa nukleotida yaitu 1.148 bp. Urutan basa-basa tersebut dianalisis dengan data Gen Bank melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Hasil BLAST memperlihatkan bahwa isolat Hb3.3 memiliki nilai query coverage yang sama sebesar 98% dan nilai identifikasi 98% dengan berbagai strain *Pediococcus pentosaceus* seperti yang terlihat pada Tabel 15.

Setelah dianalisis menggunakan Clustal W memperlihatkan kesamaan dengan termasuk *Pediococcus pentosaceus* HS2 yang merupakan salah satu dari bakteri asam laktat (BAL) (Tabel 15 dan Gambar 22). Hasil identifikasi 5 isolat BAL potensial asal fermentasi kakao Sumatra Barat, 3 isolat (G3.7, Hb2.11 dan Hb3.3) memiliki spesies yang sama yaitu *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, akan tetapi walaupun memiliki spesies yang sama potensial terhadap aktivitas antimikroba berbeda, sesuai dengan penjelasan Urnemi, Syukur, Purwati, Ibrahim, Jamsari, Mustopa dan Kim (2011), bahwa 5 isolat BAL potensial asal fermentasi kakao Sumatra Barat memiliki zona hambat yang berbeda.

Tabel 15. Hasil analisis sekuen isolat Hb3.3 dengan menggunakan BLAST

Nomor Aksesori (Accession Number)	Blast search result	Query coverage	Evalue	Max. ident
GQ421480.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> GL 28	97%	0.0	97%
F1611788.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P14	98%	0.0	98%
GO465207.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> HS2	98%	0.0	98%
HO834496.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC1	98%	0.0	98%
F1611788.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P14	88%	0.0	90%
EU483113.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> MY-880-	98%	0.0	98%



Gambar 22. Pohon filogenetik isolat Hb3.3 dengan Clustal W

*Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 asal isolat Hb3.3 adalah spesies yang paling potensial membunuh beberapa bakteri patogen seperti *Listeria sp.* Pendapat ini ditunjang Simpson dan Taguchi (1995) yang menyatakan *Pediococcus pentosaceus* sangat respon menghambat pertumbuhan patogen *Listeria monocytogenesis*. *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 lebih efektif digunakan sebagai *foodpreservativ*/bahan pengawet pada olahan daging seperti bakso, pada pembuatan keju dan yogurt. Menurut Osmanagaoglu *et al.* (2001)

bahwa *Pediococcus pentosaceus* dapat menghasilkan agen antimikroba dikenal sebagai bacteriosinnya adalah pediosin. Pediosin adalah bakteriosin yang dihasilkan menghambat beberapa spesies patogen makanan seperti *Listeria monocytogenes* yang dapat menyebabkan *Listeriosis*.

Hasil penelitian uji identifikasi molekular isolat dari fermentasi kakao Sumatera Barat sama dengan hasil penelitian Esayas *et al.* (2008), *Pediococcus pentosaceus* diisolasi dari sampel susu fermentasi, begitu juga, Ham *et al.* (2010) *Pediococcus pentosaceus* dihasilkan dari isolasi fermentasi bawang putih. Osmanagaoglu *et al.* (2011), yaitu *Pediococcus pentosaceus* dihasilkan dari isolasi sampel daging fermentasi. Dapat disimpulkan *Pediococcus pentosaceus* berasal dari sumber sampel hewan dan tanaman, akan tetapi potensinya sebagai probiotik dapat saja berbeda. Sesuai penjelasan Saputri dkk. (2012), probiotik *pediococcus pentosaceus* dapat menjaga keseimbangan mikroflora usus itik Pitalah.

## **Percobaan Tahap 2.**

### **4.2. Uji Biologis Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap Kadar Kolesterol pada Daging Itik Pitalah**

#### **4.2.1. Penghitungan Koloni Bakteri Digunakan Untuk Probiotik pada Itik Pitalah**

Tujuan penghitungan koloni BAL Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 yaitu untuk mengetahui total koloni BAL pada pemberian 1 ml, 2 ml dan 3 ml. Dari hasil penghitungan total koloni *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 didapatkan hasil pada Tabel 16.

Tabel 16 menunjukkan bahwa, total koloni 1 ml probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 yaitu berkisar  $12.7 \times 10^8$  CFU/g, untuk 2 ml yaitu  $2 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g dan untuk 3 ml yaitu  $3 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g, dari dosis yang diberikan kepada itik Pitalah pada uji biologis. Dosis ini sesuai dengan dosis anjuran, Naidu dan Clemens (1999), Jumlah total koloni BAL pada pangan probiotik memenuhi kriteria yang dinyatakan FAO/WHO (2001) adalah berada pada jumlah  $10^7 - 10^9$  CFU/g. Berarti dosis yang diberikan kepada itik Pitalah yaitu  $1,27 \times 10^7$  CFU/g sesuai dengan kriteria FAO/WHO.

Tabell 16. Total koloni, morfologi dan pewarnaan gram isolat *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 yang telah dibiakkan

No.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	Total Koloni	Morfologi	Pewarnaan Gram
1.	1 ml	$12.7 \times 10^8$ CFU/g	Kokus	(+)
2.	2 ml	$2 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g	Kokus	(+)
3.	3 ml	$3 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g	Kokus	(+)

Ketiga dosis (1 ml, 2 ml dan 3 ml) BAL *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 tersebut telah diberikan kepada itik Pitalah sebagai hewan percobaan. Pengaruh pemberian *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap kolesterol daging dan trigliserida pada telur dan bobot badan itik Pitalah didapatkan hasil sebagai berikut:

#### 4.2.2. Pengaruh Probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap Kadar Kolesterol (mg/dl) Itik Pitalah

Hasil penelitian pengaruh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada beberapa dosis terhadap kadar kolesterol daging itik Pitalah dapat dilihat pada Tabel 17.

Tabel 17. Rataan kandungan kolesterol daging itik pitalah setelah pemberian inokulum probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada berbagai dosis

Perlakuan	Rataan Kadar Kolesterol (mg/dl)
A (tanpa BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	39.23 <sup>d</sup>
B (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1x12.7 x 10 <sup>8</sup> CFU/g)	34.35 <sup>b</sup>
C (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> 2x12.7 x 10 <sup>8</sup> CFU/g)	32.67 <sup>a</sup>
D (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> 3 x 12.7 x 10 <sup>8</sup> CFU/g)	38.12 <sup>c</sup>

Keterangan : Superskrip berbeda pada kolom sama berbeda nyata pada tingkat 1% ( $p < 0.05$ )

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian dosis probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 memberikan pengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap kadar kolesterol pada daging itik Pitalah (Lampiran 7). Maka oleh sebab itu dari uji ANOVA untuk peubah kadar kolesterol pada daging itik Pitalah dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Hasil DNMRT memperlihatkan bahwa, perlakuan tanpa pemberian probiotik berbeda nyata terhadap semua dosis perlakuan (1 ml, 2 ml dan 3 ml), sedangkan setiap dosis perlakuan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) sesamanya. Kontrol (tanpa pemberian *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745), menunjukkan kadar kolesterol pada daging itik Pitalah yang paling tinggi yaitu 39,23 mg/dl berbeda nyata dengan dosis 1 mm, 2 ml dan 3 ml.

Pada perlakuan (B) yaitu dosis 1 ml ( $1 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g) *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, menghasilkan kadar kolesterol 34.35 mg/dl, pada konsentrasi 2 ml (C) menghasilkan kadar kolesterol yang nyata ( $P < 0.05$ ) paling rendah yaitu 32.67 mg/dl, ketika ditingkatkan konsentrasi pemberian inokulum *Pediococcus pentosaceus* ATCC menjadi 3 ml (D) kadar kolesterol yang dihasilkan menjadi meningkat. Pada penelitian ini probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada dosis 2 ml memiliki aktifitas optimum, akan tetapi jika ditingkatkan dosis menjadi 3 ml aktifitas enzim BSH yang dimilikinya akan menurun. Diduga pada dosis tertinggi (3 ml) membuat mikroorganisme BAL berkompetisi sehingga pertumbuhannya dan enzim BSH yang dihasilkan tidak optimal. Turunnya kadar kolesterol daging itik Pitalah sebanyak 17 % pada pemberian dosis 2 ml, disebabkan pemberian BAL yang optimum dalam usus, mengakibatkan BAL dalam usus tidak berkompetisi, sehingga enzim BSH yang dihasilkan diproduksi optimal.

Rendahnya kadar kolesterol pada daging itik Pitalah disebabkan pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, karena telah menyebabkan meningkatnya populasi BAL dalam saluran pencernaan. Penelitian pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 ini terhadap keseimbangan mikroflora usus itik Pitalah sama dengan penelitian Saputri, Syukur dan Purwati (2012), bahwasanya pemberian dosis 2 ml probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 telah meningkatkan populasi BAL dari 66,2 % (kontrol) menjadi 95,9%.

Meningkatnya populasi BAL pada usus, mengakibatkan meningkatnya asam laktat dan enzim BSH yang dihasilkan oleh BAL. Sesuai dengan pendapat

Syofyan (2010), keseimbangan mikroflora usus akan menyebabkan proses pencernaan dan penyerapan zat-zat makanan akan lebih baik, sehingga kebutuhan hidup pokoknya akan lebih cepat terpenuhi. Pengaruh Enzim BSH, yaitu berguna dalam memecah asam empedu menjadi asam empedu terkonyugasi dalam bentuk asam kholat bebas yang kurang diserap usus halus sehingga dikeluarkan melalui feses. Sebelumnya Voet *et al.* (1999) dalam Usmaini (2012) menjelaskan, peurunan kolesterol pada unggas terjadi karena metabolit yang dihasilkan BAL berkompetisi dengan HMG CoA untuk berikatan dengan enzim HMG CoA reduktase. Usman dan Hasono (1999) juga menjelaskan, BAL yang mengandung enzim BSH mampu menekan kolesterol yang terdapat pada aliran darah untuk dibawa ke hati dan digunakan untuk membentuk asam empedu yang akan dikeluarkan oleh kantung empedu, kemudian dibawa ke usus halus untuk dibuang di feses, dan juga dinding BAL berperan dalam pengikatan kolesterol. Surono (2004) menyatakan, BAL mempunyai kemampuan menurunkan kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh dengan cara pengikatan kolesterol oleh BAL sehingga menyebabkan turunnya kadar kolesterol.

Pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap kadar kolesterol daging itik Pitalah selang kepercayaan 5%. Pada perlakuan dosis 2 ml dapat menurunkan kolesterol daging sebesar 17% dibanding kontrol (tanpa perlakuan). Berbeda dengan penelitian Lee dan Salminent (2009), yaitu uji skrining beberapa BAL, ditemukan *Bifidobacterium longum* SPM1207 asal pangan probiotik Korea hanya mampu menurunkan total kolesterol serum dan LDL pada selang kepercayaan 5%, serta meningkatkan HDL serum dari tikus pada hewan percobaan. Mansoub (2010),

telah berhasil menggunakan BAL *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus casei* untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida darah ayam broiler. Purwati (2011), menggunakan *Lactococcus plantarum* asal blondo yang disertakan dalam ransum meneliti pemberian 3 ml ( $3.9 \times 10^8$  CFU/g), dapat menurunkan kolesterol pada kuning telur ayam.

#### 4.3. Uji Biologis Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap Kadar Trigliserida pada Telur Itik Pitalah

Hasil pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap kadar trigliserida telur itik Pitalah dapat dilihat pada Tabel 18.

Tabel 18. Rataan kandungan trigliserida telur itik Pitalah pada perlakuan pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 berbagai dosis

Perlakuan	Rataan Kadar Trigliserida Kuning telur (mg/ dl)	Rataan Kadar Trigliserida Campur (Kuning dan Putih Telur) (mg/ dl)
A (tanpa BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	351,87 <sup>d</sup>	258,01 <sup>d</sup>
B (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $1 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	333,81 <sup>c</sup>	192,91 <sup>c</sup>
C (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $2 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	309,03 <sup>b</sup>	125,39 <sup>b</sup>
D (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $3 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	170,12 <sup>a</sup>	73,32 <sup>a</sup>

Keterangan : superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Tabel 18 Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian dosis probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap kadar trigliserida pada kuning telur dan campuran putih dan kuning telur itik Pitalah (Lampiran 8). Maka oleh sebab itu dari uji ANOVA

untuk peubah kadar trigliserida pada telur itik Pitalah dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Hasil DNMRT memperlihatkan bahwa, perlakuan tanpa pemberian probiotik berbeda nyata terhadap semua dosis perlakuan (1 ml, 2 ml dan 3 ml), sedangkan setiap dosis perlakuan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) sesamanya. Kontrol (tanpa pemberian *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745), menunjukkan kadar trigliserida kuning telur itik Pitalah yang paling tinggi yaitu 351.87 mg/dl berbeda nyata dengan dosis 1 ml, 2 ml dan 3 ml. Pada perlakuan (B) yaitu konsentrasi 1 ml ( $1 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g) *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, menghasilkan kadar trigliserida 333,81 mg/dl pada kuning telur, pada konsentrasi 2 ml (C) ( $P < 0.05$ ) ditemukan turunnya kadar trigliserida pada kuning telur yaitu 309,03 mg/dl, ketika ditingkatkan konsentrasi pemberian inokulum *Pediococcus pentosaceus* ATCC menjadi 3 ml (D) maka kadar trigliserida turun drastis yaitu 170.12 mg/dl.

Pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap trigliserida campuran putih dan kuning telur itik Pitalah. Hasil uji DNMRT pada kontrol (tanpa pemberian probiotik) berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) sesamanya. Perlakuan A (1 ml probiotik) berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan perlakuan 2 ml dan 3 ml. Penurunannya kadar trigliserida pada campuran kuning dan putih telur secara berturut-turut dari 258.01 mg/dl menjadi 192.91 mg/dl, 125.393 mg/dl dan 73.58 mg/dl, persentase turunnya adalah 25.23 %, 51.40 %, dan 71.58 % dibanding kontrol pada campuran kuning dan putih telur.

Semakin ditingkatkan dosis probiotik, semakin turun kadar trigliserida telur (campuran putih dan telur kuning). Artinya dosis 3 ml adalah dosis yang terbaik untuk menurunkan kadar trigliserida telur (campuran kuning dan putih)

itik Pitalah, campuran putih dan kuning telur itik pitalah berdasarkan karena, biasanya telur dikonsumsi tidak dalam keadaan terpisah.

Pada hasil penelitian ini dapat diartikan bahwa, dosis 3 ml *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 adalah dosis yang efektif digunakan untuk tujuan penurunan trigliserida telur itik Pitalah. Hal ini sesuai pendapat Yunenshi, Syukur dan Purwati (2011), penelitiannya menunjukkan pada dosis 3 ml dapat menurunkan kolesterol telur itik Pitalah.

Turunnya kadar trigliserida dan kolesterol pada telur itik Pitalah disebabkan oleh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. Sesuai dengan Pendapat Sudha (2005), BAL dapat menghasilkan enzim lipase yang bisa memecah lemak bermolekul besar dari *long chain fatty acid* menjadi substrat yang lebih kecil/*short chain fatty acid* sehingga mudah diserap usus. Mahdavi *et al.* (2005) menjelaskan probiotik juga mampu mensintesis enzim esterase bersamaan dengan enzim lipase yang merubah asam lemak bebas menjadi bentuk ester pada saluran pencernaan.

Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 mampu menurunkan kadar trigliserida karena, asam lemak berantai panjang akan didegradasi menjadi asam lemak berantai pendek, sesuai dengan penelitian Suryani (2008) tentang pengaruh probiotik *Lactobacillus plantarum* 1B1 dapat menurunkan trigliserida tikus karena kemampuannya memfermentasikan karbohidrat dan menghasilkan asam lemak rantai pendek dalam saluran pencernaan tikus, karena sebagaimana kita ketahui bahwa salah satu penyebab meningkatnya trigliserida bila makanan sehari-hari mengandung karbohidrat yang berlebihan. Sebelumnya Santoso, Tanaka dan Ohtanis (1995) menjelaskan, hati mengubah karbohidrat menjadi

asam lemak, kemudian membentuk trigliserida. Trigliserida ini dibawa melalui aliran darah dalam bentuk *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). VLDL ini kemudian akan dimetabolisme oleh enzim lipoprotein lipase menjadi *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL). IDL kemudian melalui serangkaian proses akan dirubah menjadi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang kaya akan kolesterol. Dari proses diatas bisa diketahui dengan menurunkan trigliserida maka kolesterol secara tidak langsung juga akan turun. Menurunnya kadar trigliserida juga disebabkan oleh meningkatnya populasi dari BAL dalam saluran pencernaan.

#### **4.4. Pengaruh Probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap Bobot Badan itik Pitalah (kg/ekor)**

Tujuan uji bobot badan itik pitalah setelah pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 adalah untuk melihat apakah bobot daging itik akan turun, seiring turunnya kolesterol pada daging itik tersebut. Uji bobot badan itik Pitalah diukur setelah pemberian 2 kali probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 sesuai dosis perlakuan. Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 diberi selang waktu 10 hari, sedangkan 10 hari pertama adalah masa adaptasi itik Pitalah di lapangan, pada hari ke-31 diukur bobot daging itik tersebut. Pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 kepada itik Pitalah, bertujuan untuk melihat pengaruh probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC fungsinya dalam menurunkan kolesterol daging dan hubungannya terhadap bobot badan itik Pitalah. Rataan bobot Badan Itik Pitalah Setelah Pemberian Inokulum Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada berbagai dosis dapat dilihat pada Tabel 19.

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 tidak berpengaruh nyata  $P < 0.05$  terhadap bobot badan itik Pitalah (Lampiran 10). Pada Tabel 19, menunjukkan tanpa perlakuan (kontrol), dosis 1 ml, 2 ml dan 3 ml pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 terhadap itik pitalah tidak berbeda nyata sesamanya, yaitu bobot badan berkisar 1.525 kg, 1.532 kg, 1.503 kg dan 1.535 kg.

Tabel 19. Rataan bobot badan itik Pitalah setelah pemberian inokulum probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 pada berbagai dosis

Perlakuan	Rataan bobot badan (kg/ekor)
A (tanpa BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	1.525 <sup>a</sup>
B (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $1 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	1.532 <sup>a</sup>
C (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $1 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	1.503 <sup>a</sup>
D (Pemberian BAL <i>Pediococcus pentosaceus</i> $1 \times 12.7 \times 10^8$ CFU/g)	1.535 <sup>a</sup>
Signifikansi	$P < 0.05$

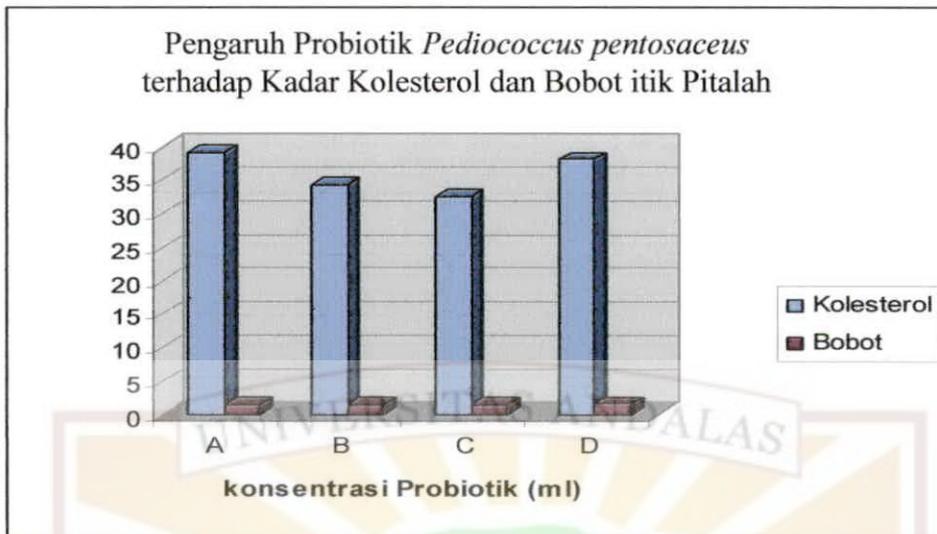
Keterangan : Superskrip berbeda pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada tingkat 5% ( $P < 0.05$ )

Tidak berpengaruh nyata pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC terhadap bobot badan, akan tetapi berpengaruh sangat nyata terhadap kadar kolesterol daging itik Pitalah, artinya walaupun kolesterolnya telah turun secara nyata, yang diuraikan di usus menjadi lemak sederhana dan dibuang melalui feses tidak mempengaruhi perubahan bobot badan. Artinya probiotik memberikan efek positif terhadap kualitas daging itik Pitalah yaitu menghasilkan daging rendah kolesterol, namun tidak mengurangi bobot badan itik. Sesuai dengan penjelasan Fuller (1989) dan Barrow (1992), dalam Husmaini (2012) mekanisme interaksi probiotik dalam saluran pencernaan adalah berkompetisinya terhadap zat makanan

dalam jumlah terbatas, elaborasi metabolit BAL untuk menghambat multiplikasi mikroba patogen, dapat memperkecil kondisi lingkungan mikroba non indogenous. Terjadinya kompetisi BAL dengan non indogenous terhadap lokasi yang berhubungan mukosa intestinal, dengan demikian keberadaan BAL yang diberikan pada penelitian ini mampu menyebabkan kondisi saluran pencernaan yang lebih baik sehingga menyebabkan lebih efisien dalam memanfaatkan makanan untuk dikonversi menjadi daging. Untuk melihat hubungan kadar kolesterol daging dan bobot badan itik Pitalah setelah pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 dapat dilihat pada Gambar 23.

Gambar 24 menjelaskan bahwa pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 tidak berpengaruh nyata pada penurunan berat badan itik Pitalah, akan tetapi berpengaruh nyata pada kadar kolesterol pada daging. Hal menunjukkan bahwa, bobot badan itik Pitalah kontrol (tanpa probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745) kurang berkualitas dibanding yang diberi probiotik karena kolesterol yang terdapat pada saluran pencernaan terhidrolisis dalam usus, sehingga persentase kolesterol berkurang, sehingga dihasilkan daging yang berkualitas, yaitu rendah kolesterol dan tetap mempertahankan bobot badan.

Pemberian probiotik pada itik Pitalah tidak saja dapat menurunkan kolesterol daging akan tetapi dapat meningkatkan kesehatan itik itu sendiri, yaitu dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen pada saluran pencernaan seperti di usus, hal ini sesuai dengan penelitian Saputri, Syukur dan Purwati (2012), bahwasanya pemberian dosis 2 ml probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 ini telah meningkatkan populasi BAL dari 66,2 % (kontrol) menjadi 95.9 %.



Gambar 23 Hubungan pengaruh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745) terhadap kadar kolesterol dan berat badan itik Pitalah )

Keterangan: (A) (Kontrol) tanpa perlakuan Probiotik BAL *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745); (B) Perlakuan dengan dosis BAL *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745) 1ml ( $1 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g)); (C). Perlakuan dengan dosis BAL *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745) 2ml ( $1 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g)); (D) Perlakuan dengan dosis BAL *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745) 3ml ( $3 \times 12.7 \times 10^8$  CFU/g))

Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, pemberian probiotik 1 ml, 2 ml, 3 ml dan kontrol walau ada peningkatan bobot badan, akan tetapi secara analisis statistik tidak berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ). Berbeda dengan hasil penelitian Husmaini (2012), pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* terhadap ayam broiler, dilaporkan semakin tinggi pemberian (1 ml dan 2 ml) mengakibatkan bobot karkas ayam meningkat, akan tetapi jika ditingkatkan lagi 3 ml bobot badan jadi menurun. Hal ini disebabkan karena probiotik Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 yang diberikan memberikan efek positif dalam kesehatan itik, yaitu dengan meningkatnya jumlah mikroflora usus, dan menghasilkan daging yang berkualitas (rendah kolesterol). Hal ini didukung oleh Fajri dan Nisa (2002), keberadaan probiotik dalam saluran pencernaan dapat

menguntungkan bagi kesehatan ternak dan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Didukung juga oleh penelitian Saputri dkk (2012) pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 2 ml dapat meningkatkan BAL pada usus mencapai 95.9%.



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Ditemukan isolat BAL potensial probiotik dari fermentasi biji kakao asal Sumatra Barat pada varietas *Trinitario*/hibrida (Hb3.3), stabil pada pH 4 sampai 6.5, efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Eschericia coli* NBRC 14237, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Listeria monocytogenesis*, *Bacillus subtilis* NBRC 3134 dan *Salmonella typhii*. Isolat Hb3.3 tersebut tahan suhu tinggi mulai suhu 45 °C sampai suhu 121 °C selama 60 menit dengan diameter zona hambat bakteriosin 35 mm. Berat Molekul Bakteriosin sekitar 10 kDa, memiliki kemiripan 98% dengan *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745.
2. Probiotik *Pediococcus pentosaceus* ATCC (Hb3.3) memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan kadar kolesterol daging dan sangat nyata untuk trigliserida telur itik Pitalah. Pemberian 2 ml *Pediococcus pentosaceus* ATCC dapat penurunan kadar kolesterol daging itik Pitalah dari 39.23 mg/dl menjadi 32.66 mg/dl, yaitu turun 17 %. Untuk pemberian dosis 3 ml dapat menurunkan kadar trigliserida telur itik Pitalah dari 258.01 mg/dl menjadi 73.32 mg/dl, yaitu turun 71.58 %.

### 5.2. Saran

Disarankan untuk melakukan kajian lanjutan tentang struktur protein atau peptida dari senyawa antimikrobal bakteriosin dengan asam amino sekuensing dan Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LCMS).

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., E. Liviawaty., dan I. Rostini. 2006. Pemanfaatan Limbah Sayuran untuk Memproduksi Biomasa *Lactobacillus plantarum* sebagai Bahan Edible Coating dalam Meningkatkan Masa Simpan Ikan Segar dan Olahan Laporan Akhir. Unpad. 113 halaman.
- Ardhana, MM and GH. Fleet, 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. Food Science and Technology, School of Chemical Sciences, The University of New South Wales, Sydney New South Wales 2052, Int. J. Food Microbiol.86: 87- 99.
- Astuti dan R. Ana, 2010. Asimilasi kolesterol dan dekonjugasi garam empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari limbah kotoran ayam secara *in vitro*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Axelsson, L.T. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology in: Salminen S., von Wright A. (eds.), Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1-63.
- Barreau, G., A. Thomas, Tompkins, G. Vanessa and de Carvalho. 2012. Draft Genome Sequence of Probiotic Strain *Pediococcus acidilactici* MA18/5M.194(4):901. DOI: 10.1128/JB.06563-11.
- Barros, R.R, M.D.G.S. Carvalho, J.M. Peralta, R.R. Facklam, and L.M. Teixeira. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human sources. J. Clin. Microbiol. 39-40, 1241-1246.
- Belviso, S., M. P. Giordano, Dolci and G. Zeppa. 2009. In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. Dairy Sci. Technol. 89 : 169-176.
- Bergey and H. David. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (edisi ke-9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.
- Betsi, G. I., E. Papadavid and M.E. Falagas. 2008. Probiotics for the Treatment or Prevention of Atopic Dermatitis: A Review of the Evidence From Randomized Controlled Trials. Am. J. Clin. Dermatol. 9(2) : 93 - 103.
- Brady, L.J., D.D. Gallaher and F.F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130 : 410-414.
- Caja, G., D. Garin and J. Mesia. 2002. Stimulating rumen function: organic acid salt as growth promoters. J Feed International. 21. 23-25.

- Caldwell, S., R.W. Hutkins, DJ McMahon, CJ Oberg, and J.R. Broadbent. 1998. Lactose and galactose uptake by genetically engineered *Pediococcus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:315-320.
- Chafai, S., F. Ibrir, N. Alloui and F. Nouicer. 2002. Effect of *Pediococcus acidilactici* feed supplementation on broiler chicken performances immunity and health. ESPA laboratory, Veterinary Department, Batna University, 05000. Algeria. 281-283.
- Chapman, S.E. Gilliland, M.L. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 15–18.
- Chien, W.W., Y. Li-Jung Yin and J. Shann-Tzong. 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J. Agric. Food Chem.* 52(5):1146-1151. (SCI)
- Christanto, A., dan S. Soepomo. 2000. Uji molekuler (polymerase chain reaction) pada otitis media supuratif kronik benigna aktif. Departemen THT-KI. Fakultas kedokteran Universitas Gajah Mada/RS Dr. Sardjito. Yogyakarta.
- Cintas, L.M., M. Juan, Rodriguez, F.M. Fernandes, K. Sletten, I.F. Nes, P.E. Hernandez and H. Holo. 1995. Isolation characterization of Pediocin L50, a new form *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Applied Environmental Microbiology Journal.* 2643-2648.
- Cobos, M.A., A. L. Coss, N.D. Ramirez, S.S. Gonzalez, and R.F. Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Sciences.* 90.26-30.
- Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salmien, and Y. Sanz. 2009. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab.* 10(1):68-78.
- Coeuret, V., M. Gueguen and J.P. Vernoux (2004). Numbers and strain of Lactobacillii in some probiotic product. *Journal international of Food Microbiology.* 97: 147-156.
- Crouch, A.A., W.K. Seow, L.M. Whitman and Y.H. Thong. 1991. Effect of human milk and infat milk formulate on adherence og giardia Intertinalis. *Journal of Tropical Medicine.* 85. 617- 619.
- Dalloul, R. A., H. S. Lillehoj, J.-S. Lee, S.-H. Lee, and K.-S. Chung. 2006. Immunopotentiating effect of a Fomitella fraxinea-derived lectin on chicken immunity and resistance to coccidiosis. *Poult. Sci.* 85.446–451.
- Daniel, A., J. Barbosa, H. Albano. J. Silva, PA. Gibbs and P. Teixeira. 2007. Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus*

*pentosaceus* strain K34 isolated from "Alheira" a CBQF/Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugalb University of Applied Sciences, Trier, Germany

- David, V. and Pollack. 2003 *Salmonella Enterica Typhi*. University Connecticut Department of Molecular and Cell Biology.
- De Man, J. C., M.E. Rogosa and Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lacto- bacilli. *J. Appl.Bacteriol.*, 23, 130-135.
- De Vuyst L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria in bacteriocin of *Lactobacillus*. Ed. 91-142. Glasgow uk: Blackie Academited Professional.
- Denbow, D.M. 2000. Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In: G.C. Whittow (eds). *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press San Diego. . 299-325.
- Dewita, S.M ., M. Salim dan E. Purwati. 2007. Uji preklinis pengaruh pemberian dadih campuran VCO terhadap kolesterol, dan trigliserida pada mencit putih jantan (*Mus musculus*). Skripsi Sarjana Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. Padang.
- Diop, M.B., R. Dibois-Dauphin, E. Tine, Jacqueline AN Thonart 2007.. Bacteriocin producers from traditinal food products. *Base*. 11: 275-281.
- Dommels, Y.E.M., R.A. Kemperman, Y.E.M.P. Zebregs, and R.B. Draaisma. 2009. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the Human gastrointestinal Tract with Daily Consumption of a Low-Fat Probiotic Spread. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (19) : 6198-204.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L.M. McMullen and Prevost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*70, 564-582, 2006.
- Duke, G.E., J.E.Bird, K.A. Daniels and R.W. Bertry. 1981. Comparative biochemistry and physiology Part A: Physiology. Department of Veterinery Biology University of Minnesofa, S.T Paul. MN. 55108. USA. 68(2): 237-240.
- Dyah, S. 2003. Penggunaan *Lactobacillus plantarum* pi28a untuk mereduksi pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan kandungan afletoksin B, pada pengolahan produk kacang. IPB. Bogor.
- Emanuel, V., V. Adrian, P. Ovidiu, C. Gheorghe. 2005. Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology*. 4 (5).403-408

- Ennahar, S., K. Sonomoto, A. Ishizaki. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J Biosci Bioeng*; 87: 705–716.
- Ernawati. 2010. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada susu kambing segar. Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Esayas, A., B. Fekadu, and S. Amutha. 2008. Effect of temperature and pH on the antimicrobial activity of inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated from Ergo, Ethiopian traditional fermented milk. *Africa Journal Microbiol.* 2, 229-234.
- Fajri dan T.A. Nisa. 2002. Pengaruh pemberian *Lactobacillus sp.* Terhadap lama dan frekuensi diare pada penderita diare akut di Instansi Rawat Inap anak RSMH Palembang .
- FAO/WHO. 2001. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina.
- FAO/WHO. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London.
- Fuller, R. 2002. Probiotic- What They are and What They Do. <http://D: Probiotic. What they and what do. Htn 1>
- Fuller, R.1992. Probiotics: The scientific basis. London.
- Giancamillo, A., F. Vitari, G. Savoini, V. Bontempo, C. Bersani, V. Dell'Orto, and C. Domeneghini. 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histol Histopathol.*23(6):651-64
- Goldin, B.R. and S. L. Gorbach. 1992. Probiotic for human. in: probiotic. The Scientific Basis(Fuller, R., ed.), Ch 13. Chapman & Hall. London. pp. 361-362, 369.
- Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J. M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of class iia bacteriocins and comparison of their activities. *Appl Environ Microbiol*; 66(4): 1744–1748.
- Ham, J.S., S.G. Lee, M.K.Kim, M.H.Oh, S.G. Jeong, D.H. Kim, S.H. Lee1, J.P. Chae1, J.Y.Lee2, and D.K. Kang1. 2010. Inhibitory activity of garlic fermented by *Pediococcus pentosaceus* KACC 91419 against antibiotic-resistant pathogens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(9): 1236 - 1243

- Haryanto, B., Supriyati dan S.N. Jarmani. 2004. Pemanfaatan probiotik dalam bioproses untuk meningkatkan nilai nutrisi jerami padi untuk pakan domba. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4 – 5 Agustus. Puslitbang Peteranakan, Bogor.298 – 304.
- Heng, .K. N., P.A. Wescombe, J.P. Burton, dan J. R. Tagg. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Bacteriocins: Ecology and Evolution. 1st ed., Riley, M. A. & Chavan, M. A., Eds. Springer, Hildberg, 45-83.
- Hu, Y., X. Wenshui, and G. Changrong. 2006. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages”. World J Microbiol Biotechnol. p. 1-11.
- Hugh,C., A. Marie and J.F. Prescott. 2003. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Published by SAGE. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, INC.
- Husmaini. 2012. Potensi *Lactobacillus plantarum* isolat dari limbah pengolahan virgin coconut oil (blondo) sebagai probiotik dan aplikasinya untuk meningkatkan performans unggas. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.
- Ignatova M., V. Sredkova and V. Marasheva. 2009 . Effect of dietary nclusion of probiotic on chickens performance and some blood indices. Biotechnology in animal husbandry ,25 ( 5-6 ): 1079-1085.
- In: De Vuyst L, E.J. Vandamme. 1991. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics, and applications. London: Chapman and Hall. P. 1(11).91-142.
- Ismöyowati dan S. Juni. 2011. Fat and cholesterol contents of local duck (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*) Meat Fed Mash, Paste and Crumble Feeds. Asian Journal of Poultry Science, 5: 150-154.
- Isolauri, E. and S. Salminen. 2008. Probiotics: Use in Allergic Disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. J. Clin. Gastroenterol. 42 (2) : 91 – 96.
- Ivanova, I., P. Kabadjova, A. Pantev, S. Danova, X. Dousset. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* Subsp. Lactis B14 Isolated from Boza/Bulgarian Traditional Cereal Beverage. Biocatalysis-Fundamental &Application. Page, 47-53.
- Jamuna, M., K. Jeevaratnam. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins, J. Gen. Appl. Microbiol., 50: 79-90.

- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar Dan Aplikasinya Analisis Molekuler*. Unri Press. Riau
- Jimenez-Diaz, R. R. Sanchez, R.M.Desmazeaud, M. Riuz-Barba, J.L.Piard, J.C. S. Plantaricins and T. two. 1993. New bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59. 1416–1424.
- Joshi, V.K., Sharma S., Rana N.S. 2006. Production, Purification, Stability and Efficacy of Bacteriocin from Isolates of Natural Lactic Acid Fermentation of Vegetables F. *Technol. Biotechnol.*, 44: 435-439.
- Kalalou, I., M. Faid, AT. Ahami. 2004. Extending shelf life of fresh minced camel meat at ambient temperature by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii*.; 7:1-6.
- Karen, I., Villarante, B., Francisco, Elegado, S. Iwatani, T. Zendo, K. Sonomoto, E. Evelyn and Guzman. 2010. Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (Hela) cell. *World J. Microbiol Biotechnol.*
- Karthikeyan, V., S.W. Santosh. 2009. Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 3 (5) pp. 233-239.
- Keputusan Menteri Pertanian. 2011. Itik pitalah primadona Sumetra Barat. Sumatra Barat Indonesia.
- Kim, J.Y., C. Cho and B.N. Cho. 2010. Plasmid DNA of high quality purified by activated charcoal. *J Biosci Bioeng.* ;110(5):608-13
- Kusmiati dan A. Malik. 2002. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pba1 pada Berbagai Media. I4(1).
- Kusumawati, N., B.S.L. Jenie, S. Setyahadi, R.D. Hariyadi. 2003. Seleksi bakteri asam laktat indigenus sebagai galur probiotik dengan kemampuan menurunkan kolesterol. *Microbiology Indonesia*, 8, 2.
- Laboratorium Nutrisi Ternak Fakultas Peternakan Univ. Andalas Padang. 2005. *Komposisi Ransum Ternak*.
- Lambert, J M., Roger, S. B. Willem, M. de Vos and K. Michiel. 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family membrans in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74(15): 4719-4726

- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. 115–176.
- Lee, D.K., J. Seok, H.B. Eun, J.K. Mi, S.L. Kyung, S.S. Hea, J.C. Myung, E.K. Jin, O.L. Kang, and J.H. Nam. 2007. Lactic acid bacteria effect serum cholesterol levels, harmful fecal anzyme activity, and affect water content. *Lipids in Health and Disease*. 8:21.
- Lee, Y.K. and Salminen. 2009. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2nd eds. Jhon Willeys abd Sons. Inc. New Jersey.
- Lee, J., Y. Kim, H. S. Yun, J. G. Kim, S. Oh, and S. H. Kim. 2010. Genetic and Proteomic Analysis of Factors Affecting Serum Cholesterol Reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(14): 4829-4835.
- Lee, P.C., S.Y. Lee, S.H. Hong and H.N. Chang. 2002. Isolation and charachterization of new succine acid producing bacteria Mannhemia succini producens MBELSSE from bovine rumen. *Appl. Microbial Biotechnol.* 58. 663-668.
- Leroy F., L and De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004; 15: 67–78.
- Li-Jung, Y., C.W. Wu dan S.T. Jiang. 2003. Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from Pork Meat. *J. Agric. Food Chem.* 51(6): 1071-1076.
- Lin, S.Y., J.W. Ayres, W. Winkler and W.E. Sandine. 1989. *Lactobacillus* effects on cholesterol: In vitro and in vivo results. *J. Dairy Res.* 72, 2885- 2899.
- Liong, M.T. 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 9(5) : 854-863
- Liong, M.T. and N.P. Shah. 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of *Lactobacillus* Strains. *International Dairy Journal.* L(15): 391-398.
- Li-Jung, Y., C.W. Wu and S.T. Jiang. 2003. Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from Pork Meat. Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan 202, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (4), pp 1071–1076
- Lozano, J.C.N., J.N. Meyer, K. Sletten, C. Peláz and F.N. Ingolf. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Microbiology.*138(9). 1985-1990

- Lu, Z., F. Breidt, H.P. Fleming, E. Altermann and T.R. Klaenhammer. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation International Journal of Food Microbiology 84 (2003) 225– 235
- Lucke, F.K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. J Meat Sci. 56 105-115.
- Lucy, H., Deegan, D. Paul, Cotter, H. Colin and R. Paul. 2005. Bacteriocins : Biological tools for bio-preservation and shelf-life extensions.. International dairy journal
- Lye, H.S., G. R. R. Ali, and M. T. Liong. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. Int. Dairy J. 20: 169-175
- Ma and Hongbao. 2006. Cholesterol and human health. The Journal of American Science. Vol. 2(1)
- Madigan, M.T., J.M. Martinko. 2006. Brock: Biology of Microorganism. Pearson Education International. ISBN 0-13-196893-9. Page.375-377.
- Mahdavi, A.H., H.R. Rahmani dan J. Pourreza. 2005. Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hen's performance. International Journal of Poultry Science. 4 (7): 488-492
- Mandal, V.S., S.K. Sen and N.C. Mandal. 2011. Isolation and characterization of Pediocin NV 5 producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from vacuum-packed fermented meat product. Indian Journal Microbiol. 51(1): 22–29.
- Mansoub, N.H. 2010. Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycerides contents and performance of broiler chickens global veterinaria 5 (3): 184-186, 2010
- Maria, P., and S. Anastasiadou. 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. Microb Cell Fact. 2009; 8: 3. Published online. 8. [10.1186/1475-2859-8-3](https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-3)
- Marteau, P. 2002. Safety aspects of probiotic products. Scand J Nutr, (In Press).
- Martinez, B., A. Redriquez and J.E. Suarez, 2000. *Lactococcin* 972 a bacterium that inhibit septum formation in *Lactococcus*. Microbiology. 146. 949-955.
- Mayahi, M., R. Jalali and Kiani. 2009. Effects of dietary probiotic supplementation on cholesterol and triglyceride levels in broiler chicks' sera. World Poultry Science Association (WPSA), 2nd Mediterranean Summit of WPSA, Antalya, Turkey, 4(7). 589-591

- Musikasang, H., A. Tani, A.H. Kittikun. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal Biotechnol.* 25: 1337-1345
- Mustopa, A.Z. 2007. Koleksi Protokol Laboratorium Bioteknologi Virologi Molekuler. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI. Bogor.
- Naidu, A.S., W.R. Bidlack and R.A. Clemens. 1999. Probiotics spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev Food SCI Nutr.* 39:13-126
- Najmuddin, A. 2006. Aktivitas antimikroba yogurt probiotik dari susu kambing saanen dan PESA (persilangan peranakan etawah dan saanen) selama penyimpanan. Skripsi. Jur. Ilmu Produksi Ternak. Fak. Peternakan IPB. Bogor
- Natalia, I., dan A. Priadi. 2008. Sifat *Lactobacilli* yang diisolasi dari usus ayam sebagai probiotik. Proseding seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Navaro, L.M., Zakazaga, F. Saenz, F. Ruiz, Larrea and C. Rorres. 2000. Bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. App. Microbiol.* 88:144
- Nengah, S., Y. Ramona, N.P. Widarini, N.P. Suarini, N.M.U. Dwipayanti, K.A. Nociantri and N.W. Nursini. 2008. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kuda Sumbawa. *Jurnal veteriner.* ISSN: 1411- 8327. Vol. 9. No. 2. Hal. 52-59.
- Nur, H.S. 2005. Pembentukan asam organik oleh isolat bakteri asam laktat pada media ekstrak daging buah durian (*Durio zibethinus murr. Bioscientiae* 2(1):15-23.
- Nurhasanah. 2004. Produksi Bakteriosin Pada Berbagai Tingkat Aerasi dan Uji Kestabilan Bakteriosin Dari Bakteri Asam Laktat Galur M6-15.
- Nurhajati, JS., I. Indrawati, N. Syaftika. 2008. Soyghurt antibacterial activity both single culture and mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* According incubation time on several species of bacteria bacteria causing diarrhea. (Thesis) (Microbiology Laboratory, Department of Biology, Padjadjaran University Documentation)
- Okade, S. 2003. Lactic Acid Bacteria of plant origin: Characteristics and applications. *Proceedings, The 2nd Asia Conference of Lactic Acid Bacteria, Taipei.* 14-15.

- Oliveira, M. L., A. P. Areas, I. B. Campos, V. Monedero, G. Perez-Martinez, E. N. Miyaji, L. C. Leite, K. A. Aires, and P. L. Ho. 2006. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect.* 8.1016-1024]
- Ooi, L.G. and M.T. Liong. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *J. Mol. Sci.*11(6), 2499-2522;
- Osmanagaoglu, O., F. Kiran and F. Ingolf. 2001. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (11), pp. 2070-2079,
- Osmanagaoglu, Ö., G. Ufuk, B. Yavuz, and C. Cumhuri. 1998. Purification and characterization of pediocin f, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. *Tr.olumef Biology.* 22 . 217-228.
- Osmanagaoglu, O., Y. Beyatli and U. Gunduz. 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from vacuum-packed sausages. *Turk. Journal Biol.* 25. Page 133-143.
- Osmanagaoglu, O., K. Fadime and I.F. Nes. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (11), pp. 2070-2079.
- O'sullivan, L., R.P. Ross and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie. Elsevier.* 593–604.
- Ouwehand, A.C., P.V. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen. Probiotics: Mechanisms and established effects. 1999. *Int. Dairy J.*9, 43-52.
- Pant. N., H. Marcotte, H. Brüssow, L. Svensson and L. Hammarström. 2007. Effective Prophylaxis Against Rotavirus Diarrhea Using a Combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and Antibodies. *Microbiol.* 7 (86): 2180 – 2187.
- Pato, U. 2003. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. *Jurnal Natural Indonesia.* 5(2): 162-166.
- Pereira, D. I. A., A. L. McCartney, and G.R. Gibson. 2003. An In Vitro Study of the probiotic Potential of a Bile-Salt-Hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* Strain, and Determination of Its Cholesterol-Lowering Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8):4743-4752.

- Pereira, DIA and R.B. Glenn. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9): 4689-4693.
- Prado, F. C., J. L. Parada, A. Pandey, and C. R. Soccol. 2008. Trends in non-dairy Probiotic Beverages. *Food Res. Int.* 41: 111-123
- Priscilla C. and Sanchez. 2009. *Philippine fermented food: principles and technology*. University of Hawaii Press. ISBN 978-971-542-554-4.Page.219-220
- Protokol Cara Kerja Media Selektif BAL 2008. Laboratorium Bioteknologi Virulogi LIPI Cibinong Bogor.
- Purwati, E. 2003. Molecular characterization of *Listeria spp.* isolated from beef, chicken and fermented fish in Malaysia Disertation.
- Purwati, E. 2011. Effect of probiotics in *Lactobacillus plantarum* origin blondo on the quality cholesterol egg of layer chicken. Telah diseminarkan pada International Seminar Faculty of Animal Husbandry, Universitas Padjadjaran, Jatinangor Campus.
- Purwati, E., S. Syukur, dan Z. Hidayat. 2005. *Lactobacillus sp.* Isolasi dari Biovicophitomega sebagai Probiotik. Di dalam Proceeding Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta.
- Rajaram G, P. Manivasagan, B. Thilagavathi and B. Saravanakumar. 2010. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Adv. J. Food Sci. Tech.*, 2: 138-144.
- Ray and Bhunia. 2007. *Fundamental Food Microbiology*. 4<sup>th</sup> Edn, CRS Press, USA.
- Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. and M.L. Chikindas. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1131–1137.
- Reid, G., and R. Friendship. 2002. Alternatives to antibiotic use; probiotics for the gut. *Anim. Biotechnol.* 13:97-112.
- Rosen, G.D. 2000. Holo-analysis of the efficaci of exogenous enzyme performance in farm animal. *Animal nutrition*. 2<sup>nd</sup> Edition. Bed Ford.73-303.
- Rostini, I. 2007. Peranan bakteri asam laktat (*Laktobacillus plantarum*) terhadap masa simpan filet merah pada suhu rendah. Tesis Master Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran Jatinangor.

- Saarela, M., R., J. Monogensen, J. Fonden, J. Matto, T. Mattila-Sandholm. 2007. Probiotikbacteria safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
- Sablon, E., B. Contreras and E. Vandamme. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria mode of action genetics and Biosynthesis edv *Biochem. Eng. Biotechnol.* 68. 21-60
- Sabrina dan G. Ciptaan. 2009. Pemanfaatan limbah pertanian untuk meningkatkan produktivitas ternak itik pada Kelompok Tani Harapan Baru Desa Jambak – Pitalah Kecamatan Batipuh Kabupaten Tanah Datar. Laporan Pengabdian Kepada Masyarakat, Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang.
- Sahar, F., Deraz, H. Martin, N.K. Eva, L. Sara, A.K. Ashraf and B. Mattiasson. 2007. Production and physicochemical charaterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 911–921.
- Sahlin, P. 1999. Fermentation as a method of food processing. Production of organic acids, pH-development and microbial growth in fermenting cereals. *Lund Institute of Technology. Lud University.* 31(11): 813-818.
- Salazar-Lindo, E., D. Figueroa-Quintanilla, M. I. Caciono, V. Reto-Valiente, G. Chauviere, and P. Colin. 2007. Effectiveness and Safety of *Lactobacillus* LB in the Treatment of Mild Acute Diarrhea in Children. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 44:571-576.
- Salminen, S., A.V., Wright, A. Ouwehand (2007). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition. CRC Press. ISBN 978-0-8247-5332-0. Page.1.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 2, 3
- Santoso, U., K. Tanaka and Ohtanis, 1995. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler hicks. *Br. J. Nutr.*, 74: 523-529.
- Saputri, F. S. Syukur dan E. Purwati. 2012. Pengaruh pemberian probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) *pediococcus pentosaceus* terhadap keseimbangan mikroflora usus dan trigliserida daging itik Pitalah. *Journal Elektronik.*
- Savadogo, C.A.T., P.W. Chien, W.W., Y. Li-Jung Yin and J.S. Tzong. 2004. Microorganisms involved in Fulani Traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pak. J. Nutr.*, 3(2): 134-139.
- Schwan, R.F., E.W. Alan. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Science.* 44(4):205–221.

- Serkedjieva J., S. Danova and I. Ivanova. 2000. Antiinfluenza virus activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* .88: 285-298.
- Shanti, R., R. Ridwan, W. Yantyati. 2008. Pengaruh inokulum *Lactobacillus plantarum* terhadap kualitas silase rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) 1A-2 dan 1BL-2. *Biodiversitas*. 7. 131-134.
- Shitandi, A., M. Alfred, and M. Symon. 2007. Probiotic characteristic of lactococcus strain from local fermented *Amaranthus hybridus* and *Solanum nigrum*. *African Crop Science Conference Proceedings* 8:1809-1812.
- SHM. 2000. *Prosedur Reagensia Kimia Klinik*. PT. Segara Husada Mandiri, Jakarta.
- Simpson W.J. and H. Taguchi. 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (eds). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Chapman and Hall, London. 125-172.
- Skotia, F.P. 2010. *Isolasi dan purifikasi inhibitor RNA helikase virus hepatitis C dari bakteriosin bakteri asam laktat S34*. Skripsi. IPB Bogor.
- Smelt, A.H.M. 2010. Triglycerides and Gallstone Formation. *Clinica Chimica Acta* 41: 1625-1631
- Stanton, C., G. Gardiner, H. Meehan, K. Collins, G. Fitzgerald, P. B. Lynch, and R. P. Ross. 2001. Market potential for probiotics. *Am. Journal. Clin. Nutr.* 73:476-483s.
- Statistik Perkebunan Indonesia dan Departemen Pertanian*, 2011. Jakarta.
- Steel, R.G.D dan J.H. Torrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statiska Suatu Pendekatan Biometrik*. Ed ke-2 Cet-2 Alihbahasa B. Soemantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Sudha, M R., C. Prashant, D. Kalpana, B. Sekhar and J. Kaiser. 2009. Probiotics as Complementary Therapy for Hypercholesterolemia. *Biology and Medicine*. Vol. 1 (4): Rev 4.
- Sujaya, I N., Y. Ramona, N.P. Widarini, N.P. Suariani, N.M.U. Dwipayanti, K.A. Nocianitri and N.W. Nursini. 2008b. Isolasi dan karakteristik bakteri asam laktat dari susu kuda Sumbawa. *J. Vet.* 9 (2) : 52 – 59.
- Surat Keputusan Menteri Pertanian. 2011. Itik Pitalah Sebagai Primadona Sumatra Barat. [http://www. Google.com](http://www.Google.com). didownload 12 Januari 2012.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT Zitri Cipta Karya. Jakarta.

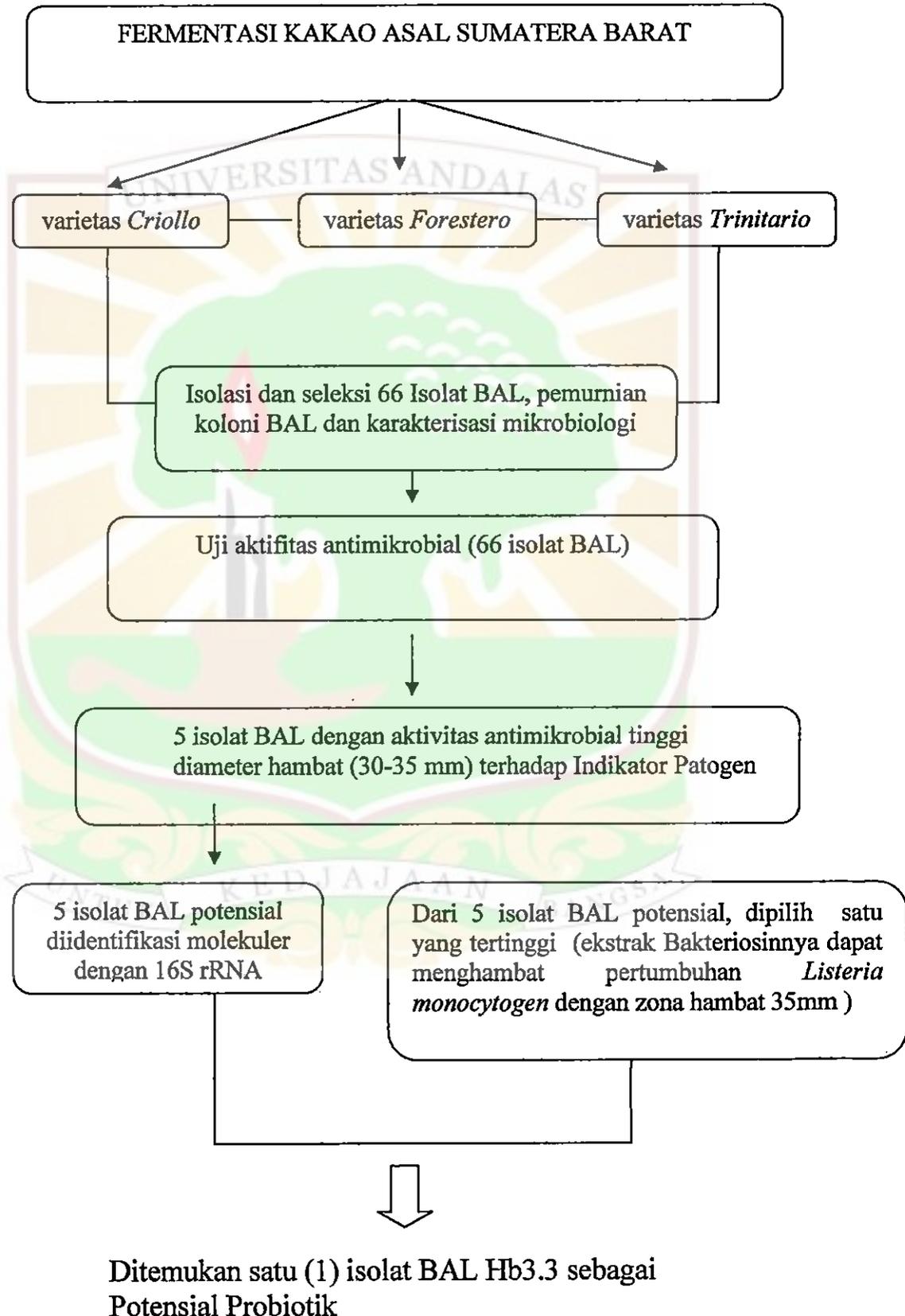
- Suryani, P. 2008. Profil kolesterol dan trigliserida darah tikus putih yang diberi pakan daging yang difermentasi *Lactobacillus plantarum* 1b1. Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Suskovic, J., B. Kos, J. Goreta and S. Matosic. 2001. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39(3):227-235.
- Sutoyo. 1998. Penapisan bakteri asam laktat asal berbagai sumber bahan hewani dan nabati dalam menghasilkan bakteriosin [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Syukur, S, Urnemi, E. Purwati, Jamsari dan Fajrul. 2011. Screening and invitro, protease activities from lactic acid bacteria associated with green cacao fermentation in West Sumatra, in Proceeding International Seminar Microbiology and Diseases. Yokohama. Japan. 15-20.
- Tabbers, M.M. and M.A. Benninga. 2007. Administration of probiotic *Lactobacilli* to children with gastrointestinal problems : There is Still Little Evidence. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 151 (40) : 2198 – 2202
- Taranto, M.P., M. Medici, G. Perdigon, A.P. Ruiz-Holgado and G.F. Valdez, 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J. Dairy Sci.*, 83:401-403.
- Taylor, S. 2004. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50. Academic Press. ISBN 978-0-12-016450-9.
- The Royal Society of Chemistry. 2010. SDS-PAGE analysis of the expression and purification of the putative bacteria hyaluronidase. *Journal Suplementary Material (ESI) for Chemical Communication*.
- Torii, S., A. Torii, K. Itoh, A. Urisu, A. Terada, T. Fujisawa, K. Yamada, H. Suzuki, Y. Ishida, F. Nakamura, H. Kanzato, D. Sawada, A. Nonaka, M. Hatanaka, and S. Fujiwara. 2010. Effects of Oral Administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the Symptoms and Serum Markers of Atopic Dermatitis in Children. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 154(3): 236-245.
- Tucker, L. 2002. Botanical Broiler: Plant Extract to maintain poultry performance. *Feed Int.* 23. 26-29.
- Unus, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit Papas Sinar Sinanti. Jakarta
- Urnemi, S., Sumaryati, E., Purwati, I., Sanusi, Jamsari, Z.M., Apon, K., Young-ung. 2011. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from cocoa fermentation against pathogenic. *Journal of Oriental Medicine Industry*. South.Korea. 3 (1). 1-8.

- Usman dan A. Hasono. 1999. Bile tolerance, turocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strain. *J. Dairy Sci.* 82:234-248.
- Usmiati, S., T. Marwati. 2007. Seleksi dan optimasi proses produksi bakteriosin dari *Lactococcus sp.* *Journal Pascapanen.* 4(1).
- Utama, A. 2000. Identification and charachterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein.465: 74-78.
- Vamanu, E., Manuel, V. Adrian, P. Ovidiu, C. Gheorghe. (2005) Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *Applied Biochemistry and Biotechnology Center – Biotehmol, Bd. Mrti no. 59, sector 1, Bucharest, Romania. African Journal of Biotechnology.* 4 (5). 403-408.
- Weichselbaum, E. 2009. Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutrition Bulletin.* 34:340–373
- Widodo, A. D. 2003. *Bioteknologi Industri Susu.* Cetakan ke-1. Yogyakarta : Lacticia Press. P 114.
- Yin, L.J.. And S.T. Jiang. 2001. *Pediococcus pentosaceus* l and s utilization in fermentation and storage of mackerel sausage. *Journal Food science.* 66. 5.
- Yoneyama, F. 2009. Lacticin Q, a *Lactococcal bacteriocin*, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:538–541.
- Yulinery, T., E. Yulianto dan N. Nurhidayat. 2006. Uji fisiologis probiotik *lactobacillus* sp mar 8 yang telah dienkapsulasi dengan menggunakan spray dryer untuk menurunkan kolesterol. *Biodiversitas* 7 (2) : 118 – 122.
- Yunenshi, F., S. Syukur, E. Purwati. 2011. Pengaruh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* asal fermentasi kakao hibrid terhadap penurunan kolesterol telur itik pitalah. Masters thesis, Program Pasca Sarjana Universitas Andalas.
- Lu, Z., F. Breidit, JR. HP. Fleming, E. Altermann, TR. Klaen Han. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology* Volume 84, Issue 2, 25 July 2003, Pages 225–235.

## Lampiran 1. Diagram alir penelitian

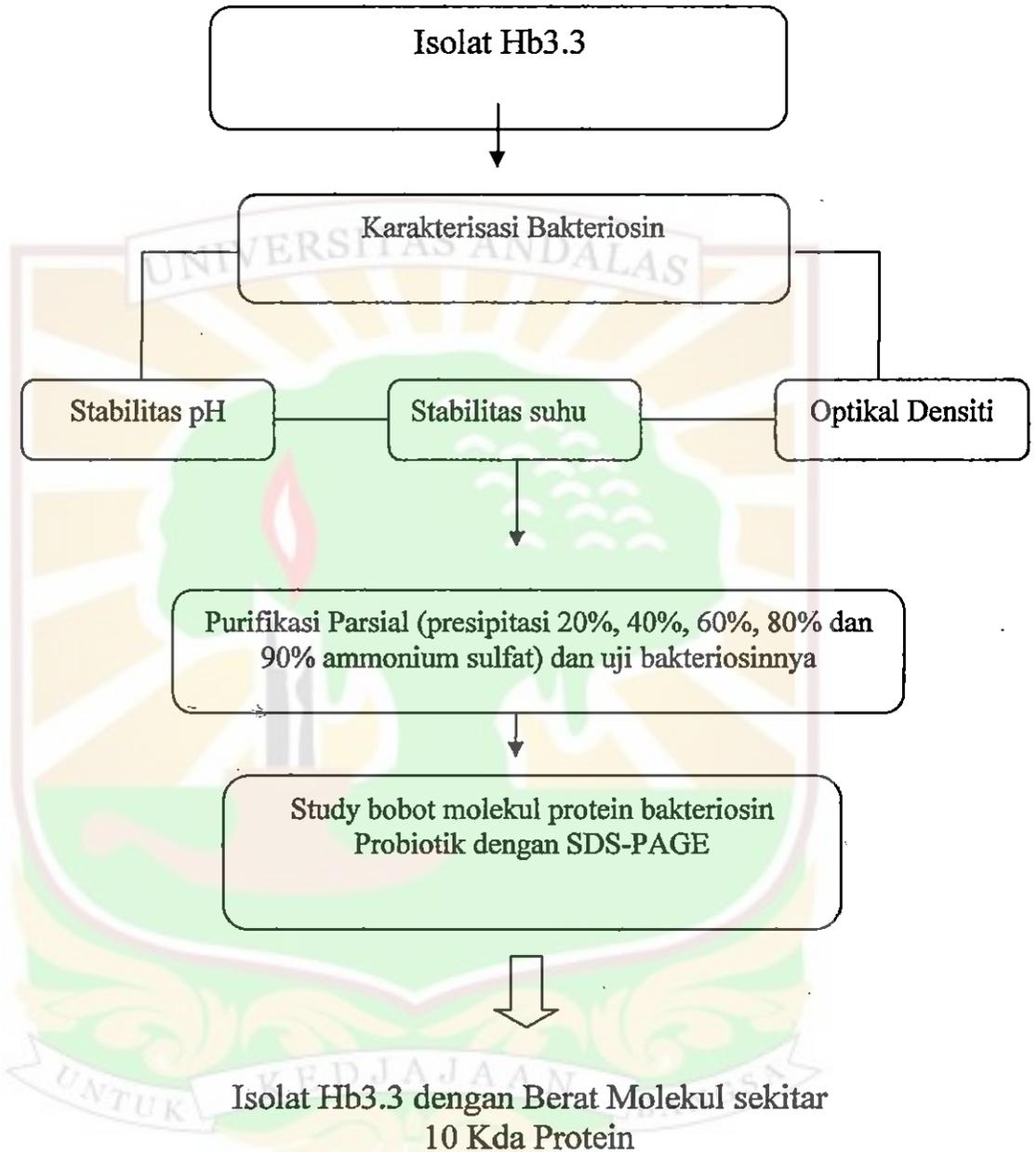
### Penelitian Tahap I.

#### A. (Isolasi BAL dan Antimikrobia)



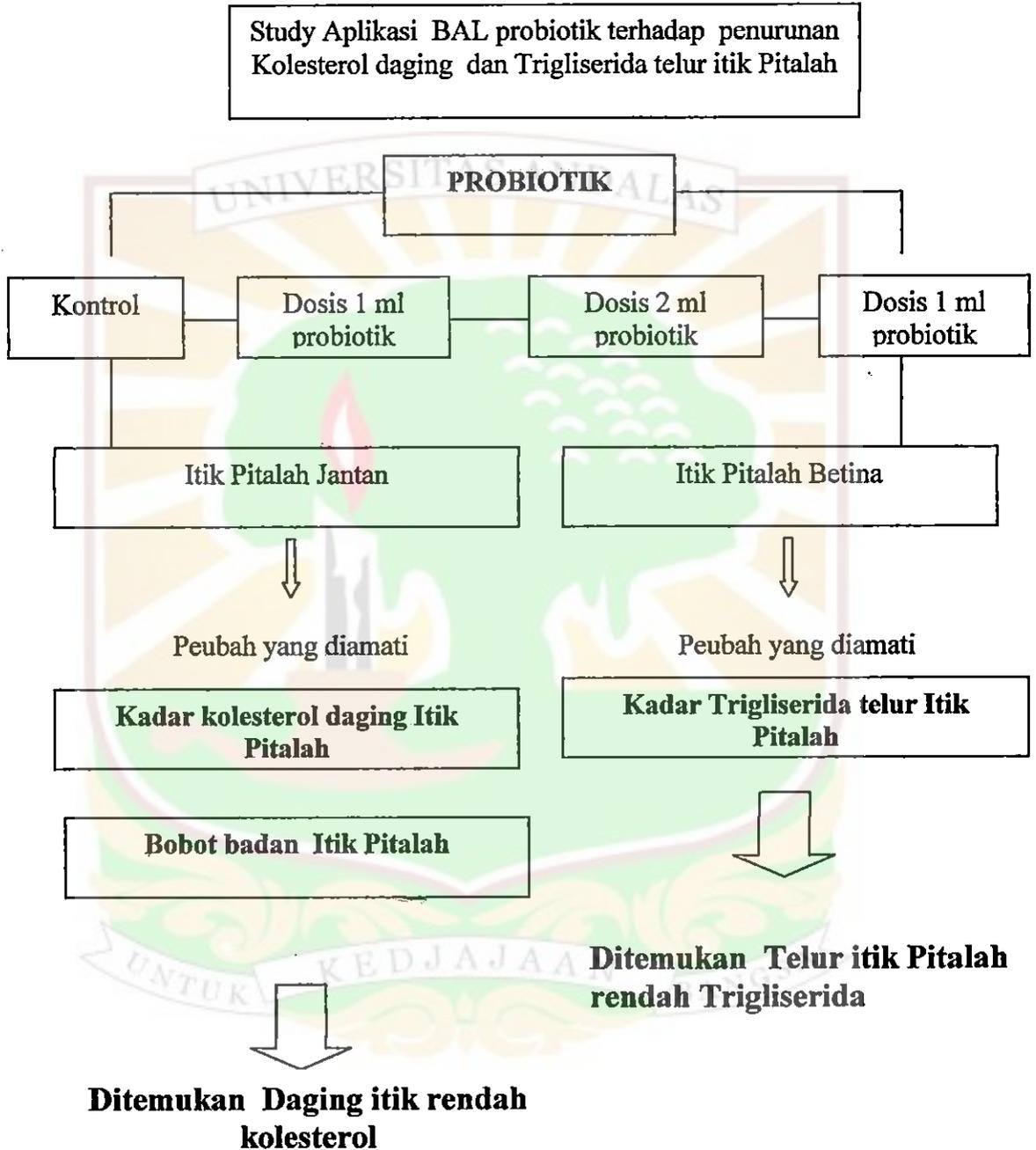
## Lampiran 1. (Lanjutan)

### B. Karakterisasi Bakteriosin



Lampiran 1. (Lanjutan)

Penelitian Tahap II. (Aplikasi BAL Probiotik Isolat Hb3.3)



**Lampiran 2. Isolasi koloni bal, pengenceran (serial delution) dan penghitungan jumlah koloni.**

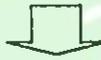
*Preenrichment*

1 g biji kakao fermentasi + 9 ml *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Broth* (Pengenceran 1 : 10), Pengenceran  $10^{-1}$ , dimasukkan dalam an aerobik jar, diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$

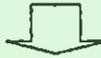


Serial Pengenceran

0,1 ml Pengenceran  $10^{-1}$  + 0,9 ml *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Broth* (Pengenceran 1 : 10), Pengenceran  $10^{-2}$  –  $10^{-7}$



100  $\mu\text{l}$  dari serial pengenceran  $10^{-7}$  diinokulasikan pada media *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Agar*, dimasukkan dalam an aerobik jar, diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$



*Single Colony* yang mencirikan BAL yang tumbuh dipindahkan ke media MRS Agar untuk pemurnian koloni kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$



BAL yang lainnya dihitung dengan menggunakan alat

*Quebec Colony Counter*.



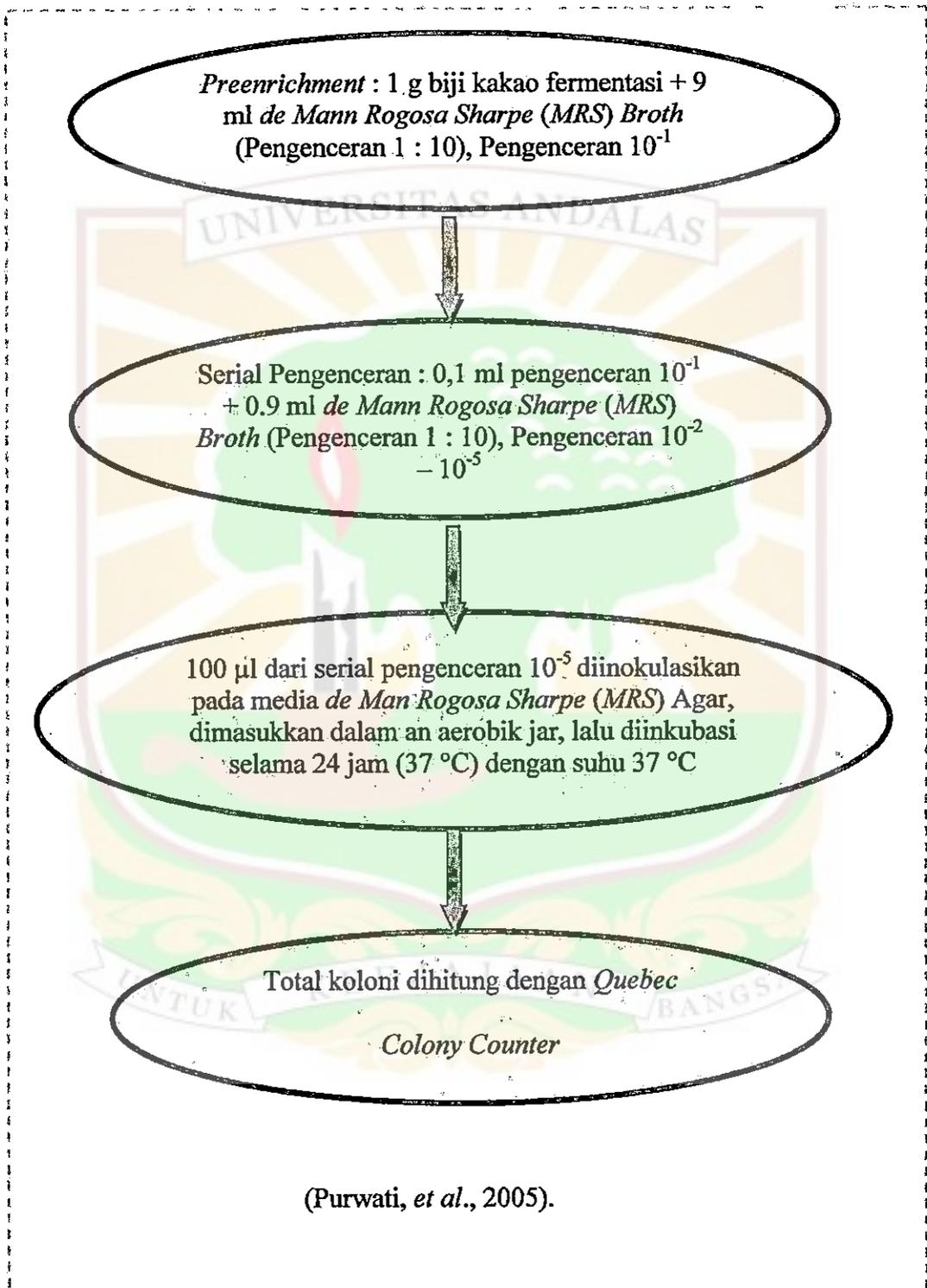
Pewarnaan gram

Skema Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) (Purwati, *et al.*, 2005)

### Lampiran 3. Penghitungan koloni bakteri asam laktat

Cara kerja Total Koloni BAL (Bakteri Asam Laktat) dapat dilihat pada

Gambar berikut ini :



(Purwati, et al., 2005).

#### Lampiran 4. Pewarnaann gram (uji morfologi BAL)

Diambil koloni tunggal dari koloni pada media MRS. Agar dengan jarum ose.

Diratakan di atas kaca benda (*preparat*)

Dikeringkan di atas bunsen atau alat pengering, ditetesi dengan zat warna *crystal violet*

Ditunggu selama 1 menit agar zat warna meresap oleh bakteri

Dibilas dengan air mengalir dan ditetesi dengan larutan iodine kompleks

Ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir

Dicuci dengan alkohol dengan cara mencelupkan ke dalam alkohol.

Ditetesi dengan zat warna safranin, lalu ditunggu 30 detik

Dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop 10 kali lipat dapat dilihat

(Purwati, 2006)

**Lampiran 5. Gambar kandang penelitian**



**Lampiran 7. Rataan kolesterol daging itik selama penelitian (mg/dl)**

Perlakuan	Ulangan	A	B	C	D	
1		39,11	34,98	32,42	38,44	
2		38,58	33,97	32,01	37,01	
3		39,99	34,09	33,54	38,90	
yi.		117,68	103,04	97,97	114,35	y..= 433,04
yi.		39,22667	34,34667	32,65667	38,11667	yi.= 36,09

FK =  $i=14j=13yij24 \times 3 = 433,04212 = 15626,97$

JKT =  $i=14j=13yij2 - FK$   
 $= 39,112 + 38,582 + \dots + 38,902 - 15626,97$   
 $= 15718,11 - 15626,97$   
 $= 91,14$

JKP =  $=13i=14yi.2 - FK$   
 $= 13(117,982 + 103,042 + 97,972 + 114,352) - 316517,60$   
 $= 15713,29 - 15626,97$   
 $= 86,32$

KTP =  $=JKPdbperlakuan$   
 $= 86,323$   
 $= 28,77$

JKG =  $=JKT - JKP$   
 $= 91,14 - 86,32 = 4,82$

KTG =  $=JKGdbgalat$   
 $= 4,828$   
 $= 0,60$

Dengan demikian diperoleh tabel Anova

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F0
Perlakuan	86,32	3	28,77	47,75
Galat	4,82	8	0,60	
Total	91,14	11		

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel di atas, untuk taraf nyata  $\alpha=5\%$ , disimpulkan untuk menolak  $H_0$  karena  $F_0=47,75 > 4,07 = F_{0,05;3;8}$ . Kesimpulan yang sama juga diperoleh untuk taraf nyata  $\alpha=1\%$  di mana  $F_{0,01;3;8}=7,59$ . Hasil ini memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari keempat perlakuan dicobakan dalam penelitian ini. Oleh karena itu selanjutnya dilakukan uji lanjut untuk memeriksa perlakuan yang memberikan hasil yang berbeda dari perlakuan yang lain dengan menggunakan uji perbandingan berganda. Dalam hal ini akan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (*Least Significance Difference*) dan uji Duncan.

### Uji Beda Nyata Terkecil

$$\begin{aligned} \text{BNT} &= t_{\alpha/2, N-a} \sqrt{K T G_n} \\ &= t_{0,05/2, 12-4} \sqrt{0,603} \\ &= 2,31 \times 0,63 \\ &= 1,46 \end{aligned}$$

Perlakuan ke-i	Perlakuan ke-i'	yi.-yi'	Keterangan
A	B	4,88	Signifikan
A	C	6,57	Signifikan
A	D	1,11	Signifikan
B	C	1,69	Signifikan
B	D	3,77	Signifikan
C	D	5,46	Signifikan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel disimpulkan bahwa untuk

taraf nyata  $\alpha=0,05$  semua pasangan perlakuan memberikan hasil yang berbeda.

### Uji Duncan

Pertama kali rata-rata perlakuan diurutkan dari yang terkecil sampai dengan yang terbesar, yakni:

yc.	=97,97
yB	.=103,04
yD	.= 114,35
yA	.=117,68

Selanjutnya dihitung nilai Rp untuk pasangan perlakuan yang melibatkan 2, 3, atau pun 4 perlakuan, yaitu:

R2	= $r_{0,05; 2; 8KTGn}=3,26 \times 0,603=1,46$
R3	= $r_{0,05; 3; 8KTGn}=3,39 \times 0,603=1,51$
R4	= $r_{0,05; 4; 8KTGn}=3,47 \times 0,603=1,55$

Dengan menggunakan nilai yang diperoleh di atas didapatkan tabel seperti berikut

Perlakuan ke-i	Perlakuan ke-i'	p	Rp	yi.-yi'	Keterangan
A	C	4	1,55	6,57	Signifikan
A	B	3	1,51	4,88	Signifikan
C	D	3	1,51	5,46	Signifikan
A	D	2	1,46	1,11	Signifikan
B	D	2	1,46	3,77	Signifikan
B	C	2	01,46	1,69	Signifikan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel disimpulkan bahwa untuk taraf nyata  $\alpha=0,05$  semua pasangan perlakuan memberikan hasil yang berbeda. Hasil ini identik dengan apa yang diperoleh dengan uji BNT



**Lampiran 8. Data kandungan trigliserida kuning telur**

Perlakuan Ulangan	A	B	C	D	
1	351,54	333,96	309,41	170,79	
2	352,09	334,07	308,59	170,00	
3	351,98	333,39	309,09	169,57	
yi.	<b>1055,61</b>	<b>1001,42</b>	<b>927,09</b>	<b>510,36</b>	y..= 3494,48
yi.	351,87	333,807	309,03	170,12	yi.= 291,21

FK =  $i = 14j = 13y_{ij} \times 3 = 3494,48 \times 12 = 1017615,87$

JKT =  $i = 14j = 13y_{ij} - FK$   
 $= 351,542 + 352,092 + \dots + 169,572 - 1017615,87$   
 $= 1079040,77 - 1017615,87$   
 $= 61424,89$

JKP =  $13i = 14y_{i.} - FK$   
 $= 13(1055,612 + 1001,422 + 927,092 + 510,362) - 1017615,87$   
 $= 1079039,23 - 1017615,87$   
 $= 61423,36$

KTP =  $JKP - db_{perlakuan}$   
 $= 61423,363$   
 $= 20474,45$

JKG =  $JKT - JKP$   
 $= 61424,89 - 61423,36 = 1,53$

KTG =  $JKG - db_{galat}$   
 $= 1,538$   
 $= 0,19$

$$=0,19$$

Dengan demikian diperoleh tabel Anova

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F0
Perlakuan	61423,36	3	20474,45	106790,7
Galat	1,53	8	0,19	3
Total	61424,89	11		

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel di atas, untuk taraf nyata  $\alpha=5\%$ , disimpulkan untuk menolak  $H_0$  karena  $F_0=106790,73 > 4,07 = F_{0,05;3;8}$ . Kesimpulan yang sama juga diperoleh untuk taraf nyata  $\alpha=1\%$  di mana  $F_{0,01;3;8}=7,59$ . Hasil ini memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari keempat perlakuan dicobakan dalam penelitian ini. Oleh karena itu selanjutnya dilakukan uji lanjut untuk memeriksa perlakuan yang memberikan hasil yang berbeda dari perlakuan yang lain dengan menggunakan uji perbandingan berganda. Dalam hal ini akan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (*Least Significance Difference*) dan uji Duncan.

#### Uji Beda Nyata Terkecil

$$\begin{aligned}
 \text{BNT} &= t_{\alpha/2, N-a} \sqrt{2KTGn} \\
 &= t_{0,05/2, 12-4} \sqrt{2 \times 0,193} \\
 &= 2,31 \times 0,36 \\
 &= 0,83
 \end{aligned}$$

Perlakuan ke-i	Perlakuan ke-i'	yi.-yi'.	Keterangan
A	B	18,063	Signifikan
A	C	42,84	Signifikan
A	D	181,75	Signifikan
B	C	24,777	Signifikan
B	D	163,687	Signifikan
C	D	138,91	Signifikan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel disimpulkan bahwa untuk taraf nyata  $\alpha=0,05$  semua pasangan perlakuan memberikan hasil yang berbeda.

### Uji Duncan

Pertama kali rata-rata perlakuan diurutkan dari yang terkecil sampai dengan yang terbesar, yakni:

$$y_D = 170,12$$

$$y_C = 309,03$$

$$y_B = 333,807$$

$$y_A = 351,87$$

Selanjutnya dihitung nilai Rp untuk pasangan perlakuan yang melibatkan 2, 3, atau pun 4 perlakuan, yaitu:

$$R_2 = r_{0,05; 2; 8KTGn} = 3,26 \times 0,193 = 0,82$$

$$R_3 = r_{0,05; 3; 8KTGn} = 3,39 \times 0,193 = 0,85$$

$$R_4 = r_{0,05; 4; 8KTGn} = 3,47 \times 0,193 = 0,87$$

Dengan menggunakan nilai yang diperoleh di atas didapatkan tabel seperti berikut

Perlakuan ke-i	Perlakuan ke-i'	p	Rp	yi.-yi'.	Keterangan
A	D	4	0,87	181,75	Signifikan
A	C	3	0,85	42,84	Signifikan
B	D	3	0,85	163,687	Signifikan
A	B	2	0,82	18,063	Signifikan
B	C	2	0,82	24,777	Signifikan
C	D	2	0,82	138,91	Signifikan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel disimpulkan bahwa untuk taraf nyata  $\alpha=0,05$  semua pasangan perlakuan memberikan hasil yang berbeda. Hasil ini identik dengan apa yang diperoleh dengan uji BNT.



**Lampiran 9. Rataan trigliserida kuning campur putih telur itik petelur selama penelitian (mg/dl)**

Perlakuan Ulangan	A	B	C	D	
1	258,85	193,49	125,21	73,18	
2	257,09	192,23	125,98	73,81	
3	258,09	193,01	124,99	72,97	
yi.	774,03	578,73	376,18	219,96	y..= 1948,9
yi.	258,01	192,91	125,3933	73,32	yi.= 31220,68

$$FK = i=14j=13yij24 \times 3 = 1948,90212 = 316517,60$$

$$JKT = i=14j=13yij2 - FK$$

$$= 258,852 + 257,092 + \dots + 72,972 - 316517,60$$

$$= 374651,51 - 316517,60$$

$$= 58133,91$$

$$JKP = 13i=14yi.2 - FK$$

$$= 131055,612 + 1001,422 + 927,092 + 510,362 - 316517,60$$

$$= 374648,22 - 316517,60$$

$$= 58130,62$$

$$KTP = JKPdbperlakuan$$

$$= 58130,623$$

$$= 19376,87$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 58133,91 - 58130,62 = 3,29 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTG} &= \text{JKG} / \text{dbgalat} \\ &= 3,298 \\ &= 0,41 \end{aligned}$$

Dengan demikian diperoleh tabel Anova

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F0
Perlakuan	58130,62	3	19376,87	47118,92
Galat	3,29	8	0,41	
Total	58133,9	11		

### Uji Beda Nyata Terkecil

Pertama kali rata-rata perlakuan diurutkan dari yang terkecil sampai dengan yang terbesar, yakni:

$$y_D = 73,32$$

$$y_C = 125,39$$

$$y_B = 192,91$$

$$y_A = 258,01$$

Selanjutnya dihitung nilai Rp untuk pasangan perlakuan yang melibatkan 2, 3, atau pun 4 perlakuan, yaitu:

$$R_2 = r_{0,05; 2; 8} \text{KTG} = 3,26 \times 0,413 = 1,21$$

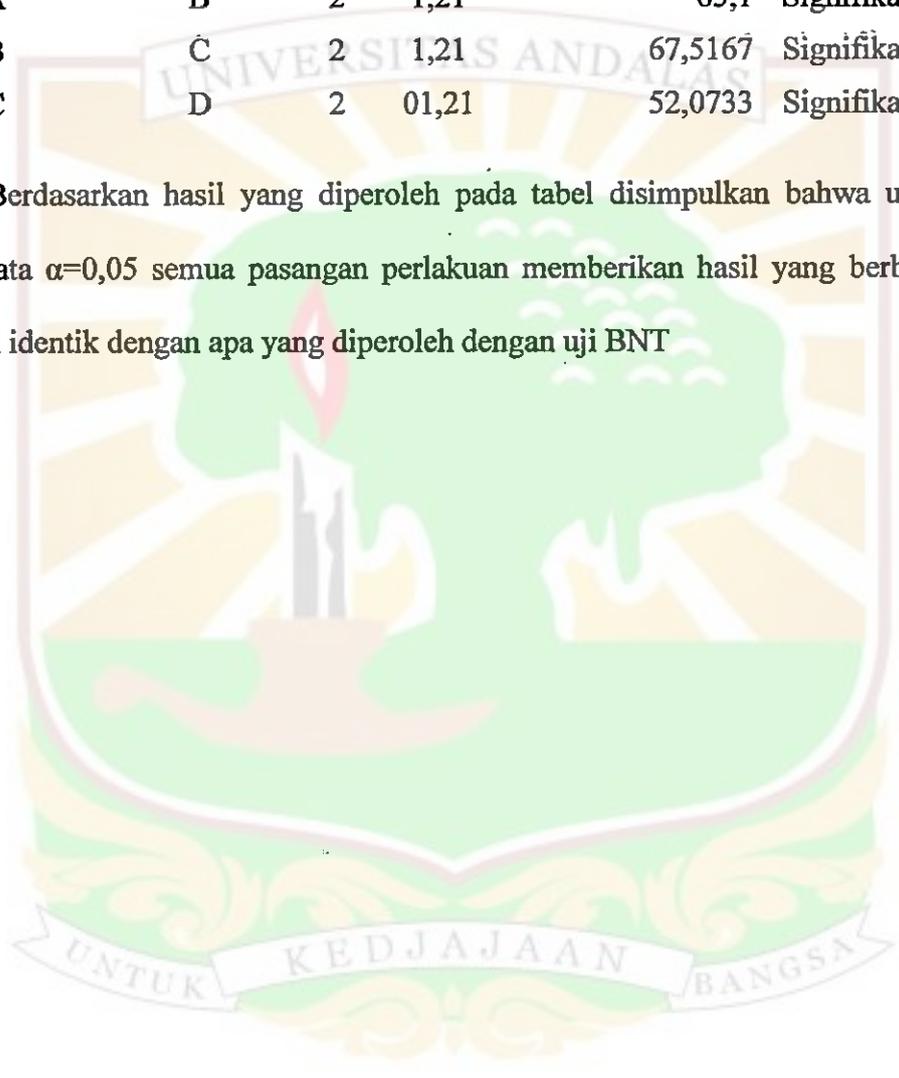
$$R_3 = r_{0,05; 3; 8} \text{KTG} = 3,39 \times 0,413 = 1,26$$

$$R_4 = r_{0,05; 4; 8} \text{KTG} = 3,47 \times 0,413 = 1,28$$

Dengan menggunakan nilai yang diperoleh di atas didapatkan tabel seperti berikut

Perlakuan ke-i	Perlakuan ke-i'	p	Rp	yi.-yi'.	Keterangan
A	D	4	1,28	184,69	Signifikan
A	C	3	1,26	132,617	Signifikan
B	D	3	1,26	119,59	Signifikan
A	B	2	1,21	65,1	Signifikan
B	C	2	1,21	67,5167	Signifikan
C	D	2	01,21	52,0733	Signifikan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel disimpulkan bahwa untuk taraf nyata  $\alpha=0,05$  semua pasangan perlakuan memberikan hasil yang berbeda. Hasil ini identik dengan apa yang diperoleh dengan uji BNT



**Lampiran 10. Data bobot badan Itik Pitalah**

Perlakuan Ulangan	A	B	C	D	
1	1,60	1,50	1,60	1,80	
2	1,45	1,55	1,87	1,48	
3	1,50	1,70	1,47	1,45	
4	1,52	1,39	1,57	1,58	
5	1,42	1,40	1,50	1,90	
6	1,40	1,45	1,50	1,60	
yi.	8,89	8,99	9,51	9,81	y.. <sub>..</sub> = 37,20
yi.	1,48	1,50	1,59	1,64	yi. = 1,55

**Uji Anova Pengaruh Perlakuan**

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan (a=4) dan 6 ulangan (n=6) sehingga terdapat 24 pengamatan (N=24). Untuk memeriksa pengaruh perlakuan pada percobaan dengan data seperti data di atas maka akan dilakukan analisis sidik ragam (anova). Dalam analisis ini digunakan model pengaruh, yaitu:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}, \quad i=1, 2, 3, 4; j=1,2,3,4,5,6$$

di mana  $y_{ij}$  merupakan data pengamatan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j,  $\mu$  rata-rata total,  $\tau_i$  pengaruh perlakuan ke-i, dan  $\epsilon_{ij}$  bentuk galat data pada perlakuan ke-i ulangan ke-j.

Di samping itu, hipotesis uji yang akan diperiksa adalah:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0 \text{ vs } H_1: \tau_i \neq 0, \text{ untuk paling sedikit satu } i,$$

dengan statistika uji  $F_0 = K_{TPKTG}$  dan kriteria uji tolak  $H_0$  pada taraf nyata  $\alpha$  jika  $F_0 > F_{\alpha, dbperlakuan, dbgalat}$ .

Berikut ini perhitungan yang diperlukan untuk uji yang dimaksud di atas.

$$FK = i=14j=13yij24 \times 3 = 37,20224 = 57,66$$

$$\begin{aligned} JKT &= i=14j=13yij^2 - FK \\ &= 1,602 + 1,452 + \dots + 1,602 - 57,66 \\ &= 58,12 - 57,66 \\ &= 0,46 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= 13i=14yi^2 - FK \\ &= 168,892 + 8,992 + 9,512 + 9,812 - 57,66 \\ &= 57,75 - 57,66 \\ &= 0,09 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} KTP &= JKP \text{ dbperlakuan} \\ &= 0,095 \\ &= 0,02 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKG &= JKT - JKP \\ &= 0,46 - 0,09 \\ &= 0,36 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} KTG &= JKG \text{ dbgalat} \\ &= 0,3620 \\ &= 0,02 \end{aligned}$$

Dengan demikian diperoleh tabel Anova

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F0
Perlakuan	0,09	5	0,02	1,042
Galat	0,36	20	0,02	
Total	0,45	25		

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tabel di atas, untuk taraf nyata  $\alpha=5\%$ , disimpulkan untuk menolak  $H_0$  karena  $F_0=1,042 < 2,607 = F_{0,05;5;20}$ . Kesimpulan yang sama juga diperoleh untuk taraf nyata  $\alpha=1\%$  di mana  $F_{0,01;5;20}=3,87$  Hasil ini memperlihatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari keempat perlakuan dicobakan dalam penelitian ini. Oleh karena itu tidak dilakukan uji lanjut.

