



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 BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) DAN KARAKTERISASI
PROTEASE DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIBRID
DISIKUCUR PARIAMAN SERTA ISOLASI PLASMIIDNYA**

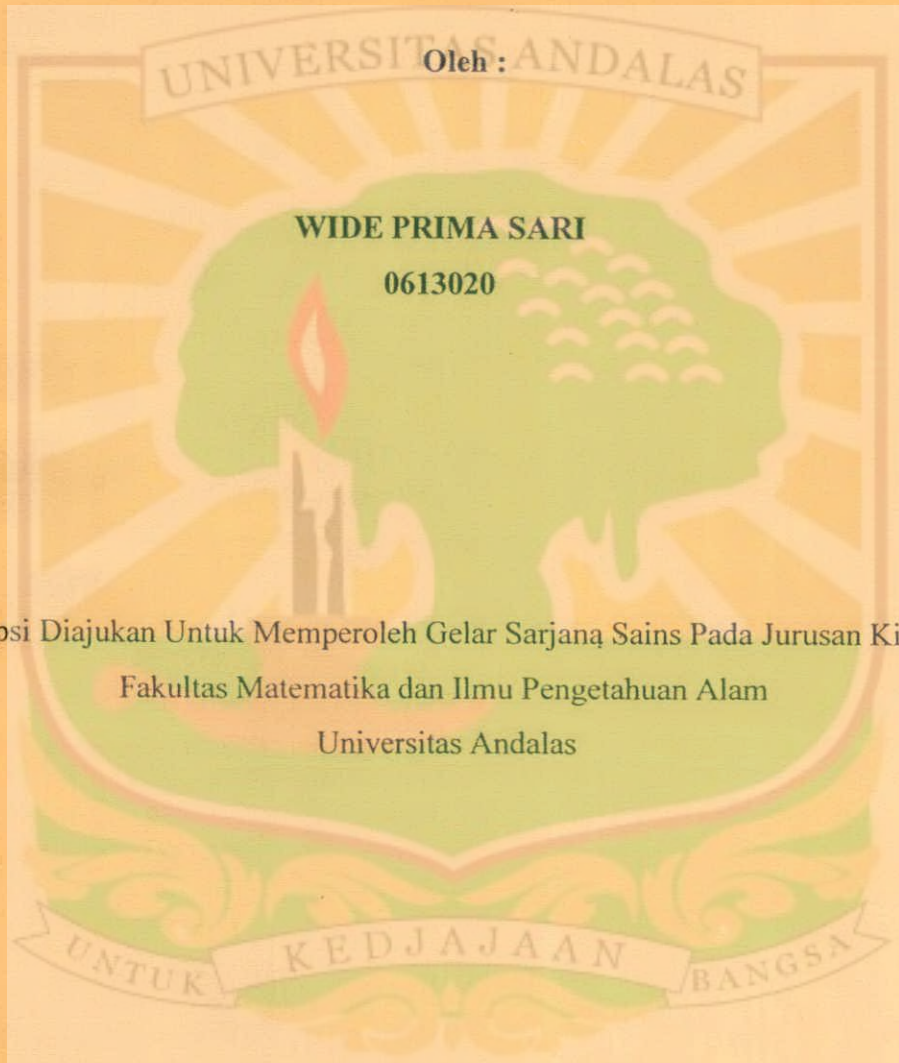
SKRIPSI



**WIDE PRIMA SARI
0613020**

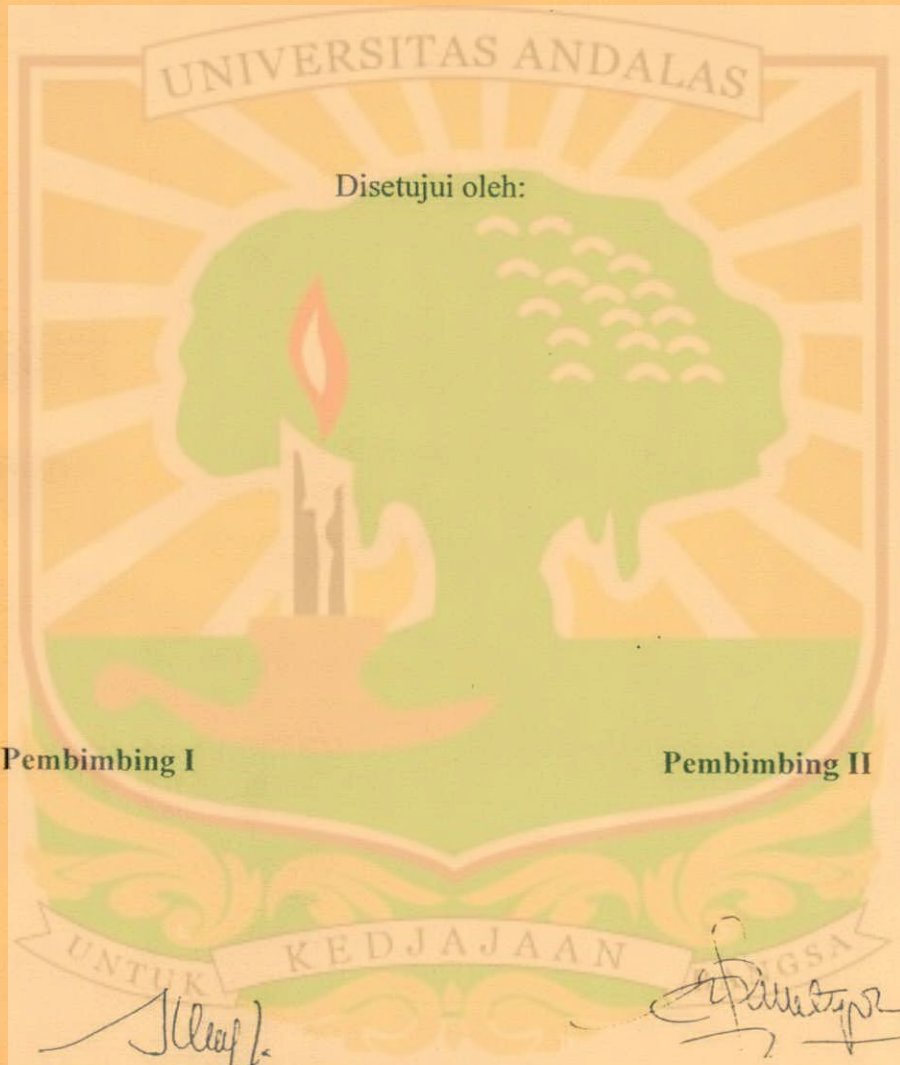
**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) DAN KARAKTERISASI
PROTEASE DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS HIBRID
DISIKUCUR PARIAMAN SERTA ISOLASI PLASMIDNYA**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Karakterisasi Protease dari Fermentasi Kakao (*Theobroma Cacao Linn*) Varietas Hibrid Sikucur Pariaman Serta Isolasi Plasmidnya, skripsi ini oleh Wide Prima Sari sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.



Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc

Dra. Marniati Salim, MS

NIP. 195501041980102001

NIP. 195604061983032001

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan judul “Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Dan Karakterisasi Protease Dari Fermentasi Kakao (*Theobroma Cacao Linn*) Varietas Hibrid di Sikucur Pariaman Serta Isolasi Plasmidnya”.

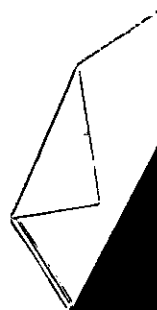
Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Universitas Andalas. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberikan dorongan moril dan materil.
2. Ibu Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc sebagai pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam pelaksanaan penelitian ini.
3. Ibu Dra. Marniati Salim, MS selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta waktunya selama ini.
4. Bapak DR. Adlis Santoni selaku ketua jurusan Kimia Universitas Andalas.
5. Bapak Hasnirwan, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan pengarahan dan nasehat selama penulis menjalani perkuliahan di Jurusan Kimia FMIPA UNAND
6. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Tiada hal lain yang dapat menggantikan semua bantuan, dukungan, kerjasama maupun bimbingan dari seluruh pihak yang telah disebutkan diatas selain doa penulis, semoga Tuhan yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang berkenan membalas semua yang telah diberikan kepada penulis. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Padang, Januari 2011

Penulis



3.3	Alat dan bahan	13
3.3.1.	Alat.....	13
3.3.2.	Bahan	13
3.4	Prosedur Kerja	14
3.4.1	Sterilisasi Alat yang Digunakan	14
3.4.2	Fermentasi Kakao Hibrid	14
3.4.3	Pembuatan Media dan Buffer.....	15
3.4.3.1	Pembuatan Media	15
3.4.3.1.1	Pembuatan Media MRS Broth	15
3.4.3.1.2	Pembuatan Media MRS agar	15
3.4.3.1.3	Pembuatan Media Pepton Water	15
3.4.3.1.4	Pembuatan Media Nutrient Agar	15
3.4.3.2	Pembuatan Buffer	16
3.4.3.2.1	Buffer Asetat	16
3.4.3.2.2	Buffer phospat.....	16
3.4.3.2.3	Buffer Borat	16
3.4.4	Isolasi dan Identifikasi BAL dari fermentasi Kakao.....	16
3.4.4.1	Perkayaan Bakteri Asam Laktat.....	16
3.4.4.2	Penanaman Bakteri ke Media Agar	17
3.4.4.3	Identifikasi dengan pewarnaan gram	17
3.4.4.4	Uji Aktivitas Antimikroba	17
3.4.5	Uji Proteolitik.....	18
3.4.5.1	Pembuatan Media Susu Skim	18
3.4.5.2	Analisa kulitatif Protease	18
3.4.6	Ekstraksi enzim kasar.....	18
3.4.7	Efek pH pada aktivitas protease.....	19
3.4.8	Efek Variasi Substrat pada Aktivitas Protease.....	19
3.4.9	Efek Suhu pada aktivitas protease	19
3.4.10	Penentuan kadar Protein enzim dengan Metoda Lowry	20
3.4.11	Penentuan Aktivitas Enzim dengan metoda Anson	20

3.4.12	Isolasi Plasmid	21
--------	-----------------------	----

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Isolasi Bakteri Asam Laktat	22
4.2	Identifikasi dengan Pewarnaan Gram	23
4.3	Pemurnian Isolat BAL	24
4.4	Uji aktimikroba	25
4.5	Uji Kualitatif Protease	29
4.6	Penentuan Kadar Protein Enzim	29
4.7	Efek Variasi Substrat pada aktivitas Protease	30
4.8	Efek pH pada aktivitas protease	31
4.9	Efek Suhu pada aktivitas protease	32
4.10	Isolasi Plasmid	33

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1	Kesimpulan	35
4.2	Saran	35

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil pewarnaan gram dan morfologi isolat BAL.....	23
Tabel 2. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri <i>Staphylococcus</i> <i>sp</i>	53
Tabel 3. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri <i>E.coli</i>	54
Tabel 4. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri <i>streptococcus sp</i>	55
Tabel 5. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri <i>pseudomonas sp</i>	56
Tabel 6. Pengamatan Zona Bening pada semua bakteri	57



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3. Koloni Bakteri Asam Laktat fermentasi Kakao dengan pengenceran 10^{-7} pada 36 jam.....	22
Gambar 4. Hasil pewarnaan gram dari BAL.....	23
Gambar 5. Hasil pemurnian isolat BAL setiap 48 jam (A) Pemurnian pertama, (B) Pemurnian kedua, (C) Pemurnian ketiga.....	24
Gambar 6. Hasil uji antimikroba isolat BAL pada waktu inkubasi 72 jam.....	25
Gambar 7. Hasil pemurnian daya antimikroba terhadap bakteri patogen <i>E.coli</i>	27
Gambar 8. Pengukuran daya antimikroba terhadap bakteri patogen <i>staphylococcus</i>	28
Gambar 9. Pengukuran daya antimikroba terhadap bakteri patogen <i>streptococcus</i>	28
Gambar 10. Pengukuran daya antimikroba terhadap bakteri patogen <i>pseudomonas</i>	29
Gambar 11. Grafik yang menunjukkan variasi jenis substrat dengan aktivitas enzim.....	31
Gambar 12. Kurva aktivitas enzim vs pH.....	32
Gambar 13. Kurva aktivitas enzim vs Suhu.....	32
Gambar 14. Hasil elektroforesis plasmid isolat H4.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja.....	37
Lampiran 2. Fermentasi Kakao	38
Lampiran 3. Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	39
Lampiran 4. Pewarnaan Gram.....	40
Lampiran 5. Isolasi Plasmid.....	41
Lampiran 6. Komposisi Media.....	42
Lampiran 7. Pemurnian Isolat.....	43
Lampiran 8. Pewarnaan Gram.....	45
Lampiran 9. Data uji antimikroba.....	47
Lampiran 10. Data pengamatan zona bening pada bakteri <i>staphylococcus</i>	53
Lampiran 11. Data pengamatan zona bening pada bakteri <i>E.coli</i>	54
Lampiran 12. Data pengamatan zona bening pada bakteri <i>streptococcus sp</i>	55
Lampiran 13. Data pengukuran zona bening pada bakteri <i>pseudomonas sp</i>	56
Lampiran 14. Pengamatan aktivitas antimikroba	55
Lampiran 15. Data kalibrasi standar BSA.....	57
Lampiran 16. Data Kalibrasi Standar Tirosin.....	59
Lampiran 17. Data Pengukuran aktivitas Enzim protease pada panjang gelombang 660 nm	60
Lampiran 18. Tabel Perhitungan Aktivitas Enzim	61
Lampiran 13. Tabel Perhitungan Aktivitas spesifik enzim	62

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Kakao (*Theobroma cacao* L) merupakan bahan makanan yang mengandung nutrisi yang relatif lengkap, karena didalamnya terdapat lemak, protein, karbohidrat, vitamin, mineral dan senyawa bioaktif lainnya. selain itu, lendir yang terdapat pada biji kakao mengandung substrat penting yang dibutuhkan oleh berbagai mikroba untuk tumbuh dan berkembang selama proses fermentasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ardhana tahun 2001, fermentasi yang dilakukan secara alami teridentifikasi adanya mikroba yang berkembang pada lendir, seperti : bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, dan yeast².

Lendir kakao biasanya berwarna putih atau putih keunguan mengandung gula seperti : glukosa, fruktosa dan sukrosa serta memiliki pH yang rendah (3,0-3,5). Kondisi ini sangat cocok untuk pertumbuhan ragi dan bakteri asam laktat. Hasil penelitian S, Thompson dan J. Pfeifer membuktikan bahwa pada fermentasi kakao diperoleh berbagai bakteri asam laktat seperti : *lactobacillus plantarum*, *lactobacillus mali*, *lactobacillus collinoides*, dll, dan berbagai bakteri asam asetat dan mikroba lainnya³.

Proses fermentasi dilakukan bertujuan untuk menumbuhkan cita rasa, aroma dan warna, karena selama fermentasi berlangsung akan terjadi perubahan fisika, kimia dan biologi dalam biji kakao. Perubahan biokimia selama fermentasi dilakukan oleh mikroba. Pada 24 jam pertama enzim akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Mikroba tumbuh pada gula ini dan suhu akan naik menjadi 4- 50 °C dan terjadilah perubahan warna pada biji kakao. Berbagai mikroba akan tumbuh disini. Pulp mengandung air dengan gula 10 – 15%. kandungan gula yang tinggi dalam pulp akan memacu pertumbuhan khamir yang mengubah gula menjadi alkohol dalam suasana anaerob. Spesies khamir yang sering ada adalah: *Caccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa* dan *Kluyveromyces marxianus*.

Selain menghasilkan alkohol juga menghidrolisis pektin yang menutupi biji. Khamir akan mati oleh alkohol yang dihasilkan dan juga oleh suhu yang makin tinggi. bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus* akan tumbuh. Pulp diaduk untuk aerasi. Adanya oksigen dan pH rendah menjadikan bakteri asam asetat tumbuh (*Acetobacter* dan *gluconobacter*).

Fermentasi biji kakao mengandung Bakteri Asam Laktat (BAL) . Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin⁴. Dengan terbentuknya zat antibakteri dan asam maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli* akan dihambat. Bakteri yang termasuk kelompok BAL adalah *Aerococcus*, *Allococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus*⁶.

BAL dikenal karena produksi senyawa antimikrobanya seperti bakteriosin. Bakteriosin BAL didefinisikan sebagai protein yang disintesis pada ribosom dan merupakan protein kompleks yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Plasmid merupakan molekul DNA sirkular kecil yang dapat masuk ke dalam bakteri dan bereplikasi sendiri, terpisah dari genom inang. Plasmid biasanya mengode gen yang memberikan sifat tertentu pada bakteri

Bakteriosin yang dihasilkan BAL merupakan substansi protein, umumnya mempunyai berat molekul kecil serta memiliki aktivitas sebagai bakterisidal dan sintesis protein ini dikode oleh plasmid.

BAL pada umumnya menghasilkan protease yang mampu memecah protein menjadi asam laktat. Protease adalah enzim yang dapat mendegradasi substrat berupa protein menjadi asam amino.

Mikroba memiliki peran penting sebagai penghasil protease karena memiliki beberapa keunggulan antara lain, mikroba memiliki siklus hidup yang singkat, efisiensi waktu dan tempat, produktivitas tinggi dan memudahkan kita untuk melakukan manipulasi genetik (melalui rekayasa genetika mikroba) maupun manipulasi dalam proses fermentasi (rekayasa bioproses). Mikroba yang telah dikembangkan secara komersial sebagai penghasil protease antara lain *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger*.

Protease merupakan enzim yang sangat penting dalam industri pangan maupun non pangan. Pemanfaatan protease dalam industri pangan diantaranya adalah untuk mengurangi kekeruhan dalam industri bir, mengurangi gluten pada industri roti, dan untuk menggumpalkan susu pada industri keju. Enzim protease dapat diperoleh dari jaringan tanaman, hewan, maupun mikroba. Keterbatasan kemampuan hewan dan tumbuhan dalam memenuhi permintaan protease, telah mendorong berkembangnya protease mikroba.

Sampai saat ini belum ada penelitian tentang isolasi dan penentuan BAL dari fermentasi kakao, uji anti bakteri, dan uji efektivitas protease serta isolasi plasmid dari tanaman kakao yang berasal dari Kabupaten Padang Pariaman.

Berdasarkan hal di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penyelidikan BAL yang diisolasi dari fermentasi biji kakao yang meliputi uji antimikroba terhadap bakteri patogen, uji aktivitas protease dan isolasi plasmid.

B. PERUMUSAN MASALAH

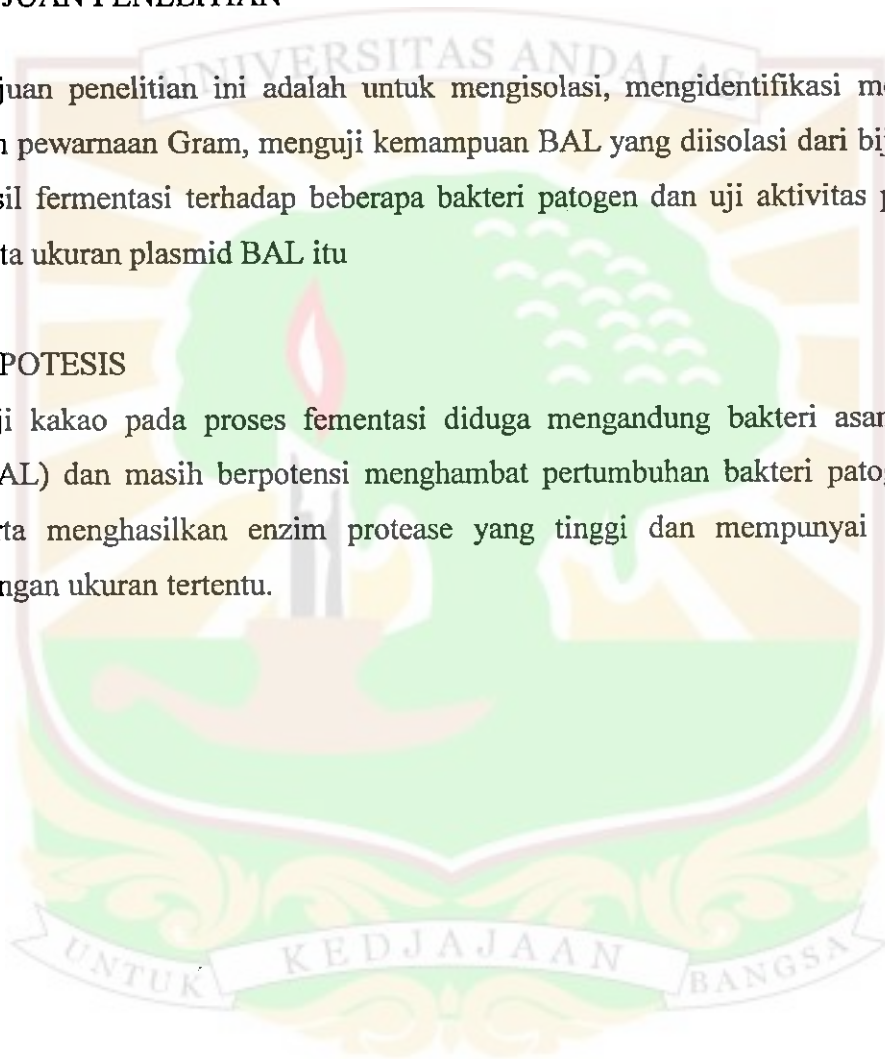
Masih belum adanya penelitian tentang identifikasi bakteri khususnya BAL yang terkandung dalam biji kakao varietas hibrid Sikucur Pariaman dan bagaimana potensinya dalam membunuh bakteri patogen, uji aktivitas protease serta isolasi plasmidnya.

C. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi, mengidentifikasi morfologi dan pewarnaan Gram, menguji kemampuan BAL yang diisolasi dari biji kakao hasil fermentasi terhadap beberapa bakteri patogen dan uji aktivitas protease serta ukuran plasmid BAL itu

D. HIPOTESIS

Biji kakao pada proses fermentasi diduga mengandung bakteri asam laktat (BAL) dan masih berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan serta menghasilkan enzim protease yang tinggi dan mempunyai plasmid dengan ukuran tertentu.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kakao

Tanaman Kakao adalah tanaman daerah tropis. Tanaman ini merupakan tanaman tahunan karena berbunga dan berbuah sepanjang tahun. Tanaman kakao berasal dari hutan-hutan didaerah Amerika Tengah dan sebagian dari Amerika Selatan. Dari tempat asalnya ini menyebar kenegara lain didunia. Kakao umbuh pada kelembapan dan temperatur agak tinggi. Kakao diklasifikasikan sebagai divisi *spermathophyta*, subdivisi *Angiospermae*, kelas *dicotyledonae*, family *sterculiaceae*, genus *theobroma* dan spesies *Theobroma Cacao L*

Jenis kakao yang banyak dibudidayakan adalah

- Criollo (Criollo Amerika Tengah dan Amerika Selatan) yang menghasilkan biji kakao bermutu sangat baik dan dikenal sebagai kakao mulia
- Foretero yang menghasilkan biji kakao bermutu sedang dan dikenal sebagai ordinary cocoa
- Trinitario yang merupakan hibrida alami dari Criollo dan Forastetero sehingga menghasilkan biji kakao yang termasuk fine flavour atau bulk cocoa

2.2. FERMENTASI KAKAO

Biji kakao segar terdiri dari lendir, kulit biji, keping biji, dan lembaga. Lendir merupakan jaringan sel halus berlendir yang membungkus biji coklat dan melekat ketat, warnanya putih dan agak keunguan. Pada buah yang belum masak lapisan lendir ini keras, kalau buah mulai masak lapisan tadi berangsur-angsur menjadi lunak.

Fermentasi merupakan suatu proses produksi suatu produk dengan mikroba sebagai organisme pemroses. Fermentasi biji kakao merupakan fermentasi

tradisional yang melibatkan mikroorganisme indigen dan aktivitas enzim endogen.

Fermentasi biji kakao tidak memerlukan penambahan kultur starter (biang), karena pulp kakao yang mengandung banyak glukosa, fruktosa, sukrosa dan asam sitrat dapat mengundang pertumbuhan mikroorganisme sehingga terjadi fermentasi.

Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghancurkan pulp (eksternal) dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji (internal). Pulp yang telah hancur akan mudah lepas dari biji sehingga biji kakao menjadi bersih dan cepat kering. Selanjutnya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji dimaksudkan untuk pembentukan prekursor cita rasa dan warna coklat¹³.

Fermentasi pada biji kakao terjadi dalam dua tahap yaitu fermentasi anaerob dan fermentasi aerob. Keberadaan asam sitrat membuat lingkungan pulp menjadi asam sehingga akan menginisiasi pertumbuhan ragi dan terjadi fermentasi secara anaerob. Fermentasi aerob diinisiasi oleh bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Produk fermentasi yang dihasilkan berupa etanol, asam laktat, dan asam asetat yang akan berdifusi ke dalam biji dan membuat biji tidak berkecambah.

2.3. MIKROBIOLOGI PADA FERMENTASI KAKAO

Ketika biji kakao masih dalam buah, lendir masih steril. Begitu pemecahan dilakukan, biji kakao segera mengalami kontak dengan udara dan pada saat itu mulai terjadi inokulasi berbagai macam mikroorganisme pada lendir dan sejak saat itu pula proses fermentasi berlangsung. Mikroorganisme yang memegang peranan yang penting dalam fermentasi biji kakao adalah ragi dan bakteri.

Lendir biji kakao segar mengandung lebih kurang 10% gula dan 2% asam sitrat. Pada tingkat pemulaan fermentasi dengan adanya sedikit udara, maka lendir

merupakan medium yang ideal untuk pertumbuhan ragi. Menurut Roumbous, lebih dari 90% dari total mikroorganisme yang tumbuh pada lendir pada awal fermentasi adalah ragi. Ragi ini bertindak sebagai mikroorganisme perintis dalam fermentasi biji kakao.

2.4. BAKTERI ASAM LAKTAT

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan Ph lingkungan menjadi 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat¹⁵. Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6-8¹⁸. Pertumbuhan bakteri ini dapat menyebabkan gangguan terhadap bakteri pembusuk dan patogen¹⁸. Bakteri yang termasuk kelompok BAL adalah *Aerococcus*, *Allococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus*¹⁶.

Bakteri asam laktat tergolong ke dalam dua kelompok utama yaitu homofermenter dan heterofermenter. Lintasan dari produksi asam laktat untuk kedua kelompok berbeda. Homofermenter menghasilkan asam laktat umumnya melalui glikolisis (Embden-Meyerhof Pathway) yaitu oleh bakteri *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* dan *Betabacteri* yang merupakan bakteri gram positif, katalase negatif dan mikroaerofil sampai anaerob, sedangkan heterofermenter oleh bakteri *Lactobacillus brevis* dan *Leuconostoc mesenteroides* yang mikroaerofil, anaerob fakultatif menghasilkan asam laktat ditambah sedikit etanol, asam asetat dan CO₂ melalui jalur 6-fosfoglukonat (fosfoketolase). Pada *Leuconostoc*, pemecahan glukosa menjadi asam piruvat, asetat, etanol dan CO₂ terjadi melalui jalur HMP sedang pada *Lactobacillus* sifat ini terjadi melalui jalur fosfoketolase¹⁸.

Pemanfaatan BAL oleh manusia telah dilakukan sejak lama yaitu untuk proses fermentasi makanan. BAL merupakan kelompok besar bakteri menguntungkan yang memiliki sifat relatif sama. Saat ini BAL digunakan untuk pengawetan dan

memperbaiki tekstur dan cita rasa bahan pangan. BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin⁴. Dengan terbentuknya zat antibakteri dan asam maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli* akan dihambat. Produksi substansi penghambat dari BAL dipengaruhi oleh media pertumbuhan, pH, dan temperature lingkungan¹⁶.

2.5. PROBIOTIK

Bakteri secara sederhana dapat dikelompokkan menjadi bakteri " baik " dan bakteri " jahat " atau patogen. Bakteri patogen inilah 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 H₂O₂ 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*¹⁴

Tidak semua bakteri baik dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik. Jenis yang dipilih harus mempunyai minimal satu dari karakteristik berikut¹⁴:

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.

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 bakteri tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.
4. Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat 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.

Bakteri yang paling banyak digunakan sebagai agen probiotik adalah golongan *Lactobacillus*. Jenis ini memiliki hampir semua karakteristik yang diperlukan. *Lactobacillus* juga dapat menurunkan pH lingkungan dengan mengubah gula menjadi asam laktat. Kondisi ini akan menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri patogen. Keistimewaan inilah yang membuat bakteri *Lactobacillus* menjadi agen untuk bermacam produk probiotik di seluruh dunia

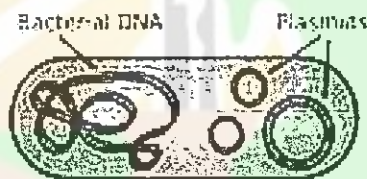
Beberapa contoh yang telah dipasarkan adalah *Lactobacillus casei strain Shirota*, diproduksi perusahaan dari Jepang. Bakteri ini mampu mengkolonisasi usus, *Lactobacillus rhamnosus VTT E-97800* yang merupakan hasil penelitian VTT di Finlandia yang memiliki kemampuan antimikroba terhadap *Candida* dan 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*

2.6. PLASMID

Setiap organisme memiliki DNA yang terletak dalam inti sel atau nukleus yang disebut sebagai DNA kromosomal, begitu pula bakteri. Selain DNA kromosomal, bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal. Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang berbeda karakternya dengan DNA kromosomal. Bentuk plasmid adalah sirkuler double helix dengan ukuran 1 kb sampai lebih dari 200 kb.

Plasmid hanya memberikan sifat istimewa yang dimiliki oleh bakteri tersebut misalnya resistensi terhadap antibiotik. Beberapa karakteristik dari plasmid yang patut diketahui antara lain: dapat bereplikasi secara terpisah dari DNA kromosomal, dapat ditransfer ke bakteri lain, dan memiliki ORI (*Origin of replication*).

Perbedaan dari DNA kromosomal dan plasmid dapat dilihat dari gambar di bawah ini:



Gambar 1. Struktur sel bakteri

Plasmid berdasarkan fungsinya dapat dikelompokkan menjadi:

1. *Fertility-F-plasmids*, merupakan plasmid yang dapat ditransfer dari satu sel ke sel bakteri lain untuk proses konjugasi
2. *Resistance-(R)plasmids*, mengandung gen yang resisten terhadap antibiotik atau racun.
3. *Col-plasmid*, mengandung gen yang mengkode protein (bakterosin) yang dapat membunuh bakteri lain
4. *Degradative plasmids*, yang mampu mencerna substansi yang tidak biasa, contoh toluen dan asam salisilat.
5. *Virulence plasmids*, yang menjadikan bakteri tersebut patogen

Selain fungsi, plasmid juga memiliki bentuk yang beragam, antara lain:

1. *Supercoiled (covalently closed-circular)*: DNA berbentuk sirkular dengan bentuk rantai yang terpilin
2. *Relaxed circular*: Kedua ujung DNA menyatu dan berbentuk sirkuler
3. *Supercoiled Denature*: kedua ujung DNA menyatu tapi pasangan basanya tidak sempurna
4. *Nicked open circular*: rantai DNA yang terpotong pada salah satu sisi saja
5. Linier: rantai DNA lurus yang terpotong pada kedua sisinya



Gambar 2. Bentuk-bentuk plasmid

Berbagai macam bentuk plasmid itu akan mempengaruhi kecepatan migrasi plasmid dalam elektroforesis. Urutan migrasi bentuk-bentuk plasmid tersebut dari yang paling cepat adalah *supercoiled*, *supercoiled denaturated*, *relaxed circular*, *linear*, dan *nicked open circular*. Bentuk plasmid yang semakin kecil atau ramping akan lebih mudah bergerak melalui pori gel agarose sehingga akan mencapai bagian bawah terlebih dahulu.

Plasmid memiliki fungsi yang bisa dimanfaatkan keuntungannya, maka ada banyak cara yang digunakan untuk mengisolasi plasmid tersebut.

Untuk memisahkan DNA kromosom dengan plasmid ada 2 pendekatan yang dapat digunakan untuk membedakan keduanya

- plasmid pada umumnya berada dalam struktur tersier yang sangat kuat atau dikatakan mempunyai bentuk *covalently closed circular* (CCC) sehingga DNA plasmid jauh lebih tahan terhadap denaturasi apabila dibandingkan dengan DNA kromosom. Oleh karena itu, aplikasi kondisi denaturasi akan dapat memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom.
- Untuk memisahkan DNA plasmid, membran sel dilisis dengan penambahan detergen. Proses ini membebaskan DNA kromosom, DNA

plasmid, RNA, protein dan komponen lain. DNA kromosom dan protein diendapkan dengan penambahan potasium. DNA + protein + potasium yang mengendap dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Supernatan yang mengandung DNA plasmid, RNA dan protein yang tersisa dipisahkan. Kemudian ditambahkan RNase dan protease untuk mendegradasi RNA dan protein. Akhirnya DNA plasmid dapat dipresipitasi menggunakan etanol.

2.7. PROTEASE

Protease adalah enzim yang menghidrolisis protein menjadi asam amino. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme . Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease dibatasi oleh tersedianya tanah untuk penanaman dan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan. Disamping itu proses produksi protease dari tumbuhan sangat memakan waktu. Protease tumbuhan yang dikenal antara lain papain, bromelain, dan keratinase. Protease hewan yang paling dikenal adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan rennin. Enzim-enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan jumlah besar .

Penggunaan mikroorganisme sebagai sumber enzim protease dan kemungkinannya untuk melakukan manipulasi genetik, menjadikan protease mikroba lebih banyak dikembangkan. Mikroorganisme menghasilkan begitu banyak variasi enzim dan kebanyakan diantara mereka dihasilkan dalam jumlah sedikit dan merupakan protease dalam sel. Enzim protease dari mikroorganisme bisa berada dalam sel atau diluar sel (ekstraseluler). Enzim ekstraseluler biasanya mampu menguraikan nutrisi yang tidak larut seperti selulosa, protein dan pati dan nutrisi yang terurai ini dibawa kedalam sel dimana digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhan²⁶.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan ilmu pengetahuan Alam Universitas Andalas. Penelitian ini dilakukan bulan Maret 2010 sampai Desember 2010.

3.2. Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahap. Tahap pertama mengisolasi bakteri yang terdapat pada fermentasi kakao. Jenis kakao yang digunakan adalah kakao hibrid yang di ambil di kabupaten Padang Pariaman. Dilanjutkan dengan pemurnian dan budidaya bakteri asam laktat yang dihasilkan. Tahap kedua pewarnaan gram dan uji antimikroba. Tahap ketiga pengujian optimasi melalui parameter konsentrasi substrat, pH, suhu. Serta tahap terakhir adalah isolasi plasmid BAL.

3.3. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, *laminar air flow cabinet*, cawan petri, botol reagent, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, jarum ose, pipet tetes, bunsen, magnetic stirer dan hot plate, vortex, tabung eppendorf 1,5 dan 2 ml, pipet mikro, tip mikro,elektroforesis, sentrifugasi, gel dokumentasi, oven, desikator, shaker, kertas saring, timbangan analitik, kertas label, dan alat-alat lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah biji kakao varietas hibrid, MRS broth (Merck), MRS Agar (Merck), aquadest, susu skim, TCA, reagen Lowry, buffer fosfat,, buffer pH bervariasi, SDS 2 %, kloroform : isoamilalkohol (24:1),

Na₂CO₃, isopropanol, etanol 70 %, agarose, buffer 0,5 x TBE (Tris-Boric-EDTA), Ethidium Bromide, 10 x BPB (Bromo Phenol Blue), Kristal Violet, Safranin, alkohol 96%, Iodine, *Escheria Coli*, *Streptokokus sp.*, *staphylococcus aureus*, *pseudomonas sp*, antibiotik amoksilin, tetrasiklin, ciprofotaksin, dan kertas cakram. NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, Na₂tartrat, Reagen folin 2N (Sigma), Bovine Serum Albumin, Tirosin, Kasein, Susu sapi segar (Bear Brand), Susu Cair (Indomilk, ultramilk).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat

Alat gelas dibungkus dengan aluminium foil, pipet mikro diletakan dalam wadahnya, ditutup rapat dan diberi selotip, tabung eppendof dimasukan kedalam *beaker glass*, lalu ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C, tekanan 15 lb selama 15 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan membakarnya diatas api bunsen hingga membara, dibiarkan sebentar baru kemudian digunakan untuk setiap kali penggunaannya.

3.3.2. Fermentasi Kakao Hibrid (Trinitario)

Sampel kakao varietas hibrid yang digunakan berasal dari daerah Sikucur, Kampung Dalam Kabupaten Padang Pariaman. Buah Kakao yang diambil merupakan buah kakao yang telah matang. Buah kakao di kupas dan diambil biji dan plasentanya, kemudian dibungkus dengan daun pisang yang sudah disterilkan. Plup dan plasenta yang telah dibungkus tadi, disimpan di dalam toples yang telah dilubangi. Difermentasi selama 36 jam pada suhu kamar.

3.4.3. Pembuatan Media dan Buffer

3.4.3.1. Pembuatan Media

1. Pembuatan medium MRS Broth (Merck)

MRS broth ditimbang 52,2 gram dalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi selama 15 menit.

2. Pembuatan media MRS Agar (Merck)

MRS broth ditimbang 62,8 gram dalam erlenmeyer 2000 mL lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi 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

3. Pembuatan media Pepton Water 10 % (Bacto)

Pepton Water ditimbang 10 gram dalam erlenmeyer 2000 mL dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai benar-benar larut, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 0,9 mL dan sterilkan pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

4. Pembuatan media Nutrient Agar (Merck)

Nutrien Agar ditimbang 28 gram dalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai homogen kemudian disterilkan pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi selama 60 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri.

3.4.3.2. Pembuatan Buffer

3.4.3.2.1. Buffer Asetat pH 4 dan 5

Buffer Asetat pH 4 dan 5 dibuat dengan cara melarutkan CH_3COOH 0,1 M dan 13,6 g/l CH_3COONa . Untuk pH 4 dipipet 8,5 ml CH_3COOH dan 1,5 ml CH_3COONa cukupkan volumenya dengan penambahan Aquadest hingga 200 ml. Sedangkan untuk pH 5 dipipet 3,6 ml CH_3COOH dan 6,4 ml CH_3COONa cukupkan volumenya dengan penambahan aquadest hingga 200 ml.

3.4.3.2.2. Buffer Posfat pH 6 dan 7

Buffer posfat dibuat dengan cara melarutkan 17,418 gram K_2HPO_4 dan 13,606 gram KH_2PO_4 masing-masing dalam 500 ml aquadest. Untuk pH 6 dipipet 34 ml K_2HPO_4 dan 58 ml KH_2PO_4 larutkan hingga tanda batas 200ml. Untuk pH 7 dipipet 61 ml K_2HPO_4 dan 39 ml KH_2PO_4 cukupkan volumenya dengan penambahan aquadest hingga 200 ml.

3.4.3.2.3. Buffer Borat pH 8, 9 dan 10

Dibuat dengan melarutkan $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dengan H_3BO_3 . Untuk buffer borat pH 8 dipipet 43,75 ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dan 2,65 ml H_3BO_3 . Sedangkan untuk buffer borat pH 9 Dipipet 23,45 ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dan 38,26 ml H_3BO_3 masing-masing dilarutkan dalam labu 200 ml hingga tanda batas.

3.4.4 Isolasi dan Identifikasi BAL dari Fermentasi Kakao

3.4.4. 1. Enrichment Bakteri asam laktat.

Sebanyak 1 gram pulp dan plasenta kakao hasil fermentasi dimasukkan ke dalam 10 ml MRS broth. Dan lakukan inkubasi selama 24 jam.

3.4.4. 2. Penanaman Bakteri ke Media Agar

Kultur dari media pengayaan divortex dan diambil 1 ml dan diencerkan sampai 1×10^{-7} , kemudian 1 ml larutan kultur disemprotkan ke media agar dan diratakan dengan hokey stick, dan diinkubasi secara anaerob selama 48 jam.

3.4.4.3. Identifikasi dengan Pewarnaan Gram¹⁷

Identifikasi dengan pewarnaan Gram ditentukan dengan menggunakan kultur bakteri yang berumur 18 jam di dalam *Nutrient Agar*. Satu koloni bakteri ditotolkan pada kaca objek yang sebelumnya telah ditetaskan NaCl, kemudian diratakan dengan ose membentuk bulatan. Kaca objek dipanaskan sampai NaCl yang telah mengandung koloni bakteri kering. Ditetaskan sebanyak 3 tetes *crystal violet* pada kaca objek dan dibiarkan 1 menit, kemudian dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik. Kaca objek ditambahkan larutan lugol iodine sebanyak 1 tetes dan biarkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan larutan alkohol sampai tidak ada lagi warna ungu yang tersisa. Dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik. Kemudian ditambah dengan safranin sebanyak 2 tetes dan diamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, kaca objek dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik. Kaca objek dikeringkan dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali.

3.4.4.4. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap empat bakteri uji yaitu *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas sp*. Metoda yang digunakan adalah metoda cakram. Sebanyak 1 koloni tunggal BAL ditanam pada 10 ml media MRS broth dan diinkubasi selama 24 jam. Kultur BAL yang ditanam pada MRS broth kemudian divortex. Bakteri patogen ditanam pada 10 ml media LB dan diinkubasi selama 1 malam. Sebanyak 15 ml media NA dituang kedalam cawan petri dan biarkan sampai mengeras. Sebanyak 1 ml bakteri patogen

diinokulasi kedalam media NA dengan metoda *spread* dan diratakan menggunakan cotton bud steril. Kertas cakram dimasukkan kedalam cairan isolat (kultur BAL) dan dimasukkan dalam media NA yang telah diinokulasi dengan bakteri patogen. Dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk pada jam ke-24, 48 dan 72 jam.

3.4.5. Uji proteolitik

3.4.5.1. Pembutan Media Susu skim

Sebanyak 1,2 g media NA ditambahkan dengan 1 % susu skim dan dilarutkan dalam 60 ml aquadest, kemudian disterilisasi. Tuang media kedalam cawan petri steril dan biarkan sampai dingin dan simpan selama semalam.

3.4.5.2. Analisa Kualitatif Protease

Cawan petri yang berisi media susu skim dibagi menjadi 4 bagian. Pada masing-masing bagian ditanam isolat yang berbeda sebanyak 1 ose dan dilakukan duplo. Diinkubasi pada suhu 37 C dan diamati zona bening yang terbentuk 24, 48, 72 jam.

3.4.6. Ekstraksi Enzim Kasar

Sebanyak 1 ose isolat dari MRS agar dimasukkan dalam 10 ml MRS broth yang mengandung 1% gram susu skim. Kemudian diinkubasi secara anaerob selama 24 jam. Setelah diinkubasi, disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Diambil supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim.

3.4.7. Efek pH pada aktivitas protease

Sebanyak 1 ml larutan ekstrak kasar enzim protease diinkubasi dengan 2 ml kasein 2% selama 30 menit pada suhu 40⁰C didalam 2 ml buffer yang berbeda dengan nilai pH (pH 4 dan 5 pada 0,05 M buffer asetat, pH 6 dan 7 pada 0,05 buffer posphat dan pH 8 dan 9 pada 0,05 M buffer borat). Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 ml TCA 0,1M. Setelah 30 menit disentrifuse 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 40⁰ C. Supernatan dianalisa dengan metoda Anson.

3.4.8. Efek Variasi Substrat Pada Aktivitas Proteinase

Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim diinkubasi dengan 2 ml substrat yang berbeda yaitu kasein, susu bubuk , susu cair, susu sapi (bear brand) dan susu skim selama 30 menit pada suhu 40⁰C didalam 2 ml 0,05 M buffer fosfat. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 ml TCA 0,1M. Setelah 30 menit sampel disentrifuse 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 40⁰C. Supernatan dianalisa dengan metoda Anson.

3.4.9. Efek suhu pada aktivitas protease

Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim diinkubasi dengan 2 ml kasein 2% selama 30 menit pada suhu yang bervariasi antara 30,35,40,45,50,55 dan 60⁰C didalam 2ml 0,05 M buffer fosfat. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 4 ml TCA 0,1M. Setelah 30 menit sampel disentrifuse 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 40 C. Supernatan dianalisa dengan metoda Anson.

3.4.10. Penentuan Kadar Protein Enzim dengan Metoda Lowry

Diambil ekstrak kasar enzim yang disimpan pada suhu 2⁰C, siapkan stok Bovine Serum Albumin dan reagen lowry. Sampel berupa ekstrak kasar enzim dihomegenkan dengan vortex, pipet 0,5 ml sampel kedalam labu ukur 10 ml dengan menggunakan pipet mikro 1000 ul. tambahkan 0,7 ml reagen lowry C divortex dan inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi tambahkan 0,1 ml pengompleks reagen folin fenol cialocetau's divortex lagi dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Sambil menunggu inkubasi hidupkan dan stabilkan spektrofotometer UV-VIS. Setelah 30 menit pindahkan 1,3 ml larutan kekuvet dan lakukan pengukuran secara kuantitatif pada panjang gelombang 615 dengan menggunakan blanko aquabides. Setelah pengukuran sampel selesai lakukan pengukuran larutan standar BSA.

3.4.11. Penentuan Aktivitas Enzim dengan Metoda Anson

Sebanyak 2 ml ekstrak kasar enzim, ditempatkan dalam suatu tabung. Kemudian tambahkan 2 ml buffer phospat 0,05 M. Tambahkan 4 ml kasein 2 %, inkubasi selama 30 menit. Tambahkan 4 ml TCA 0,1 M. Setelah diinkubasi, sampel disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan 4 ml NaOH 0,5 N. Tambahkan 1 ml pereaksi folin, divortek dan diamkan selama 30 menit. Ukur serapannya pada panjang gelombang 660 nm. Dari pengukuran serapan pada panjang gelombang 660 nm akan didapat absorban. Absorban ini kemudian dikonversi ke persamaan regresi standar tirosin sehingga didapat konsentrasi enzim protease. Nilai konsentrasi enzim protease ini dibagi dengan waktu inkubasi sehingga didapatkan nilai aktivitas enzim protease.

3.4.12. Isolasi plasmid dengan metoda lisis alkali

Sebanyak 1 isolat BAL dari MRS agar ditanam pada 10 MRS broth. Kultur BAL diinkubasi selama 24 jam. Sebanyak 2 ml kultur BAL disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit, pisahkan antara supernatan dan pelet. Pelet diambil dan disentrifue 5 menit pada 14000 rpm, lakukan hal diatas sebanyak 3 kali agar didapatkan banyak pelet. Pelet diresuspensi dengan 200ul larutan STE dan 100 ul lisozim, inkubasi selama 10 menit. Campuran divortex dan tambahkan larutan II yang berupa 200 ul SDS dan 200 ul NaOH. Campuran dibolak balik selama 5 menit. Tambahkan 150 ul kalium asetat 3N, bolak-balik dan letakkan dalam es selama 15 menit kemudian sentrifuse 14000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dipindahkan dalam tabung yang baru , tambahkan 500 ul CI (kloroform : isoamilalkohol). Sentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 15 menit. Pelet ditambahkan 500 ul etanol dingin, bolak balik dan sentrifuse 14000 rpm selama 15 menit. Pelet diambil dan ditambakan dengan etanol dingin 70%, sentrifuse 14000 rpm selama 10 menit. Kering anginkan pelet sampai semua etanol menguap dan larutkan pelet yang mengandung DNA plasmid dengan TE buffer. Plasmid dielektroforesis dengan tegangan 100 V selama 30 menit.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Dari hasil isolasi Bakteri Asam laktat yang telah dilakukan, diperoleh 8 isolat BAL yang berasal dari fermentasi kakao varietas Trinitario dengan lama fermentasi 36 jm.

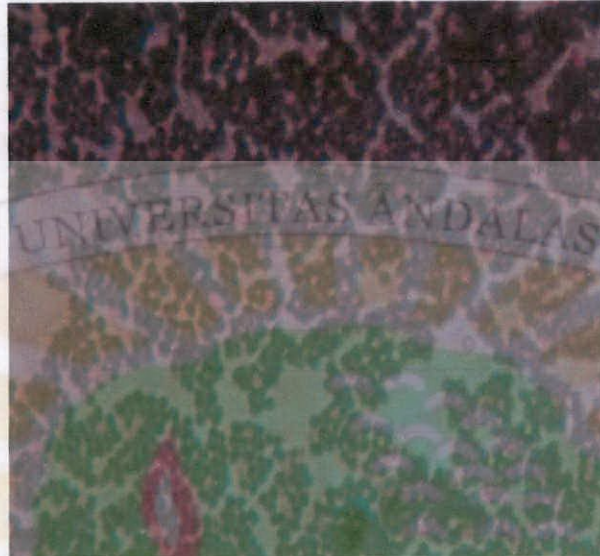


Gambar 3. Koloni Bakteri Asam Laktat fermentasi Kakao dengan pengenceran 10^{-7} pada 36 jam

Media isolasi dan seleksi yang digunakan adalah media MRS agar, dimana media itu merupakan media yang selektif untuk BAL. Penampakan BAL pada media MRS Agar berupa koloni yang berwarna putih susu. Jadi dari hasil penelitian yang dilakukan, membuktikan bahwa pada fermentasi biji kakao terdapat Bakteri Asam Laktat. Dari gambar 3, terlihat koloni bakteri hasil fermentasi kakao yang sudah tumbuh terpisah dengan baik. Bentuk koloni bulat, ukuran bervariasi, berwarna putih. Morfologi koloni bakteri yang ditemukan setelah dilakukan pemurnian bermacam-macam, bentuknya ada yang sirkular dan iregular, elevasi bakteri ada yang cembung dan datar, permukaannya halus dan mengkilap. Bentuk pinggir atau marginnya ada yang bulat penuh

4.2. Pewarnaan Gram

Dari pewarnaan gram yang telah dilakukan menunjukkan bahwa BAL yang diisolasi dari biji kakao merupakan bakteri gram positif berbentuk coccus dengan warna biru keunguan.



Gambar 4. Hasil pewarnaan gram dari BAL

Warna ungu dari pewarnaan gram positif terjadi karena bakteri tersebut menyerap warna dari kristal violet. Bakteri gram positif akan mengambil warna kristal violet yang berwarna ungu walaupun sudah dicuci dengan alkohol dan ketika diberi safranin yang berwarna merah, bakteri tersebut tetap akan berwarna ungu sedangkan warna merah menunjukkan gram negatif. Hal ini disebabkan juga karena perbedaan peptidoglikan dan permeabilitas membran, organisme gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan, bersifat kompak dan kurang permeabel sehingga pada saat pemberian kristal violet, maka zat warna tersebut memasuki dinding sel dan pada saat pencucian dengan alkohol, warna ungu yang telah terikat tersebut tidak bisa keluar lagi karena dinding sel yang kompak dan kurang permeabel sehingga warna safranin tidak bisa lagi mewarnai bakteri gram positif.

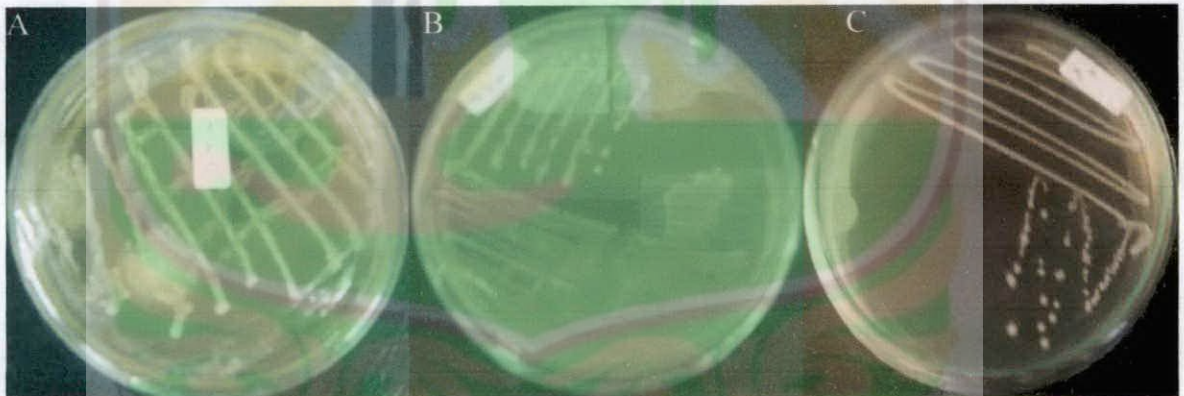
Dari tabel 1 dapat dilihat hasil pewarnaan Gram dan pengamatan morfologi dibawah mikroskopis dengan pembesaran 100x dari 8 isolat BAL

Tabel 1. Hasil pewarnaan gram dan morfologi isolat BAL

No	Kode Isolat	Gram	Morfologi
1	H1	+	coccus
2	H2	+	coccus
3	H3	+	coccus
4	H4	+	coccus
5	H5	+	coccus
6	H6	+	coccus
7	H7	+	coccus
8	H8	+	coccus

4.3. Pemurnian Isolat BAL

Pemurnian isolat BAL dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang benar-benar murni yang akan digunakan untuk uji selanjutnya. Pemurnian dilakukan sebanyak 3 kali dan hasilnya seperti gambar 5

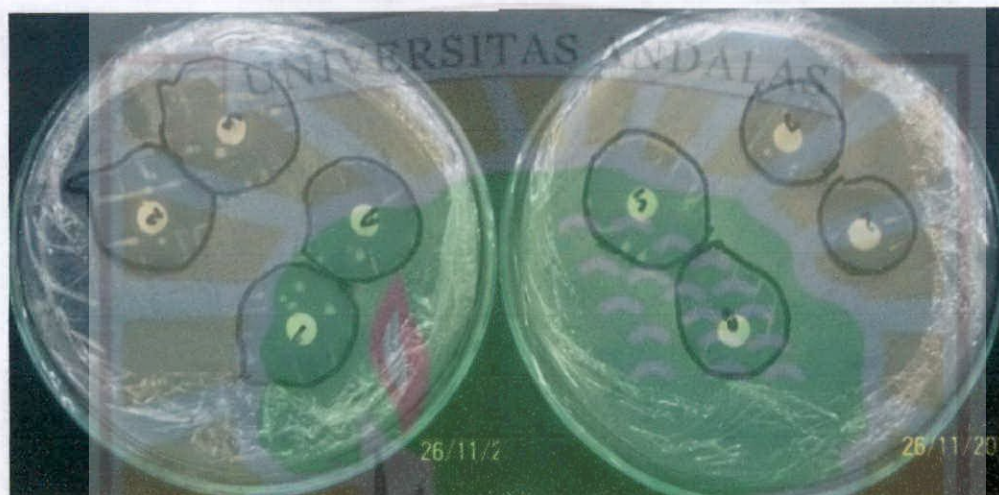


Gambar 5. Hasil pemurnian isolat BAL setiap 48 jam (A) Pemurnian pertama, (B) Pemurnian kedua, (C) Pemurnian ketiga

Hasil penanaman pertama dimurnikan pada media yang baru sehingga didapatkan hasil pemurnian yang pertama, hasil pemurnian pertama dimurnikan lagi dengan cara yang sama sehingga didapat hasil pemurnian kedua, hasil pemurnian kedua ini dimurnikan kembali untuk mendapatkan hasil pemurnian yang ketiga. Hasil pemurnian yang ketiga ini diinokulasi pada media agar miring untuk uji selanjutnya dan disiapkan untuk stok yang disimpan pada suhu $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4. Uji Antimikroba

Uji antimikroba dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit. Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini ada 4 jenis bakteri patogen, yaitu *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Streptococcus sp*.

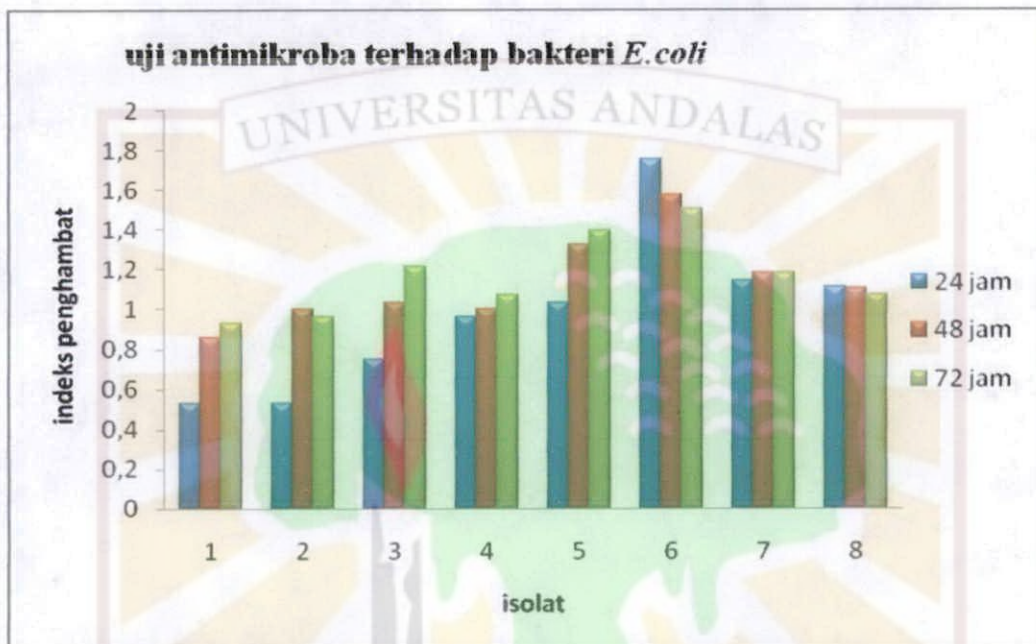


Gambar 6. Hasil uji antimikroba isolat BAL pada waktu inkubasi 72 jam

Uji aktifitas antimikroba dilakukan terhadap 8 isolat. Dari gambar 6 terlihat bahwa semua isolat memberikan zona bening, ini menandakan bahwa semua isolat memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri patogen yang ada.

Setiap isolat aktif menghambat pertumbuhan bakteri patogen pada berbagai variasi waktu inkubasi. Ada isolat yang aktif pada jam ke-24, ada yang aktif pada jam ke-48 dan 72 jam. Perbedaan indeks hambat yang diberikan oleh isolat dikarenakan setiap isolat diduga merupakan bakteri yang berbeda dan mempunyai kemampuan yang berbeda pula dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

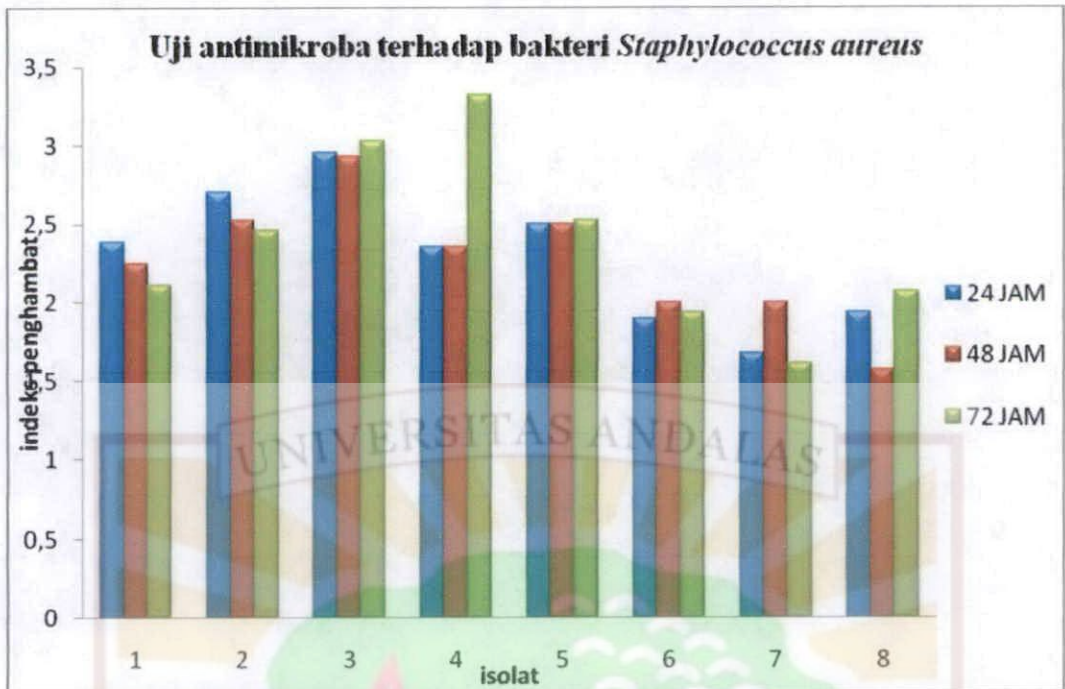
Pada uji antimikroba terhadap bakteri patogen *E.coli*, semua isolat mampu menghasilkan zona penghambat yang cukup besar . Isolat H6 memberikan zona hambat terbesar diantara isolat yang lain pada waktu 24 jam, seperti terlihat pada gambar 7. Ini menandakan bahwa isolat H6 efektif menghambat bakteri *E.coli* pada waktu 24 jam.



Gambar 7. Hasil pemurnian daya antimikroba terhadap bakteri patogen *E.coli*

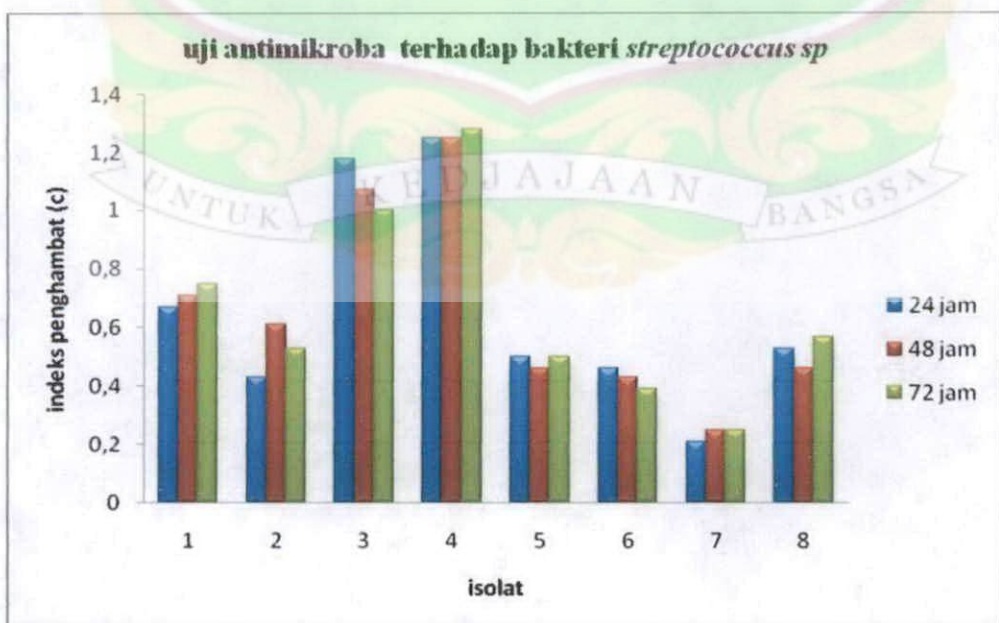
Sedangkan untuk isolat yang lain efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* pada waktu 48 dan 72 jam. Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Ada yang cepat menghambat bakteri patogen dan ada yang lama.

Pada uji antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa zona hambat terbesar dihasilkan oleh isolat H 4 pada waktu 72 jam. Ini berarti bahwa isolat H4 efektif menghambat bakteri staphylococcus pada waktu 72 jam. Seperti yang terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengukuran daya antimikroba terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*

Isolat H4 memberikan zona hambat terbesar untuk bakteri *Streptococcus sp* baik pada 24 jam, 46 jam dan 72 jam dibandingkan dengan isolat yang lain. Zona hambat terkecil diberikan oleh isolat H7 yaitu 0,35 cm. Ini berarti isolat H7 kurang efektif dalam menghambat bakteri *streptococcus* bila dibandingkan dengan isolat lainnya. Ini terlihat pada gambar 9.



Gambar 9. Pengukuran daya antimikroba terhadap bakteri patogen *Streptococcus sp*

4.5. Uji kualitatif protease

Uji kualitatif enzim protease dilakukan untuk mengetahui bahwa isolat BAL mampu menghasilkan zona bening didalam media nutrien agar yang telah ditambahkan dengan susu skim. Dengan menghasilkan zona bening berarti isolat itu mengasilkan enzim protease yang dapat menghidrolisis protein susu skim menjadi asam-asam amino.

Susu skim mengandung kasein, dimana kasein itu merupakan protein susu yang berukuran besar dan tidak larut dalam air membentuk suatu suspensi yang berwarna putih.

Dengan adanya enzim ekstraseluler protease bakteri, kasein akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein dalam media susu skim ditandai dengan zona bening disekitar koloni. Pada penelitian ini zona bening yang terbentuk tidak begitu besar. Dari semua isolat H4 memberikan zona bening yang cukup besar bila dibandingkan dengan isolat yang lainnya. Untuk uji lanjutan yang berupa karakterisasi protease, isolat yang akan diuji adalah isolat H4.

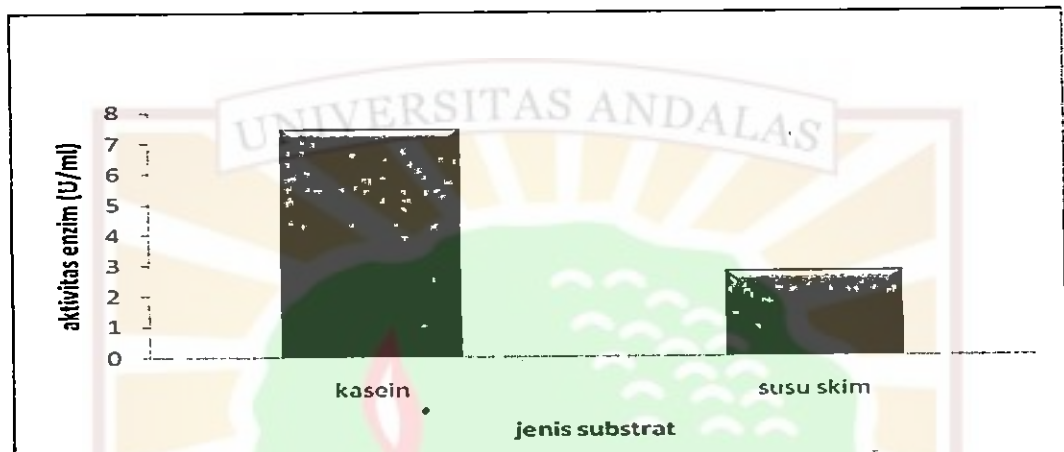
4.6. Penentuan Kadar protein Enzim

Pada uji sebelumnya, hanya mengetahui apakah isolat BAL mampu menghasilkan enzim protease, tidak bisa mengetahui berapa kadar protein enzimnya, untuk itu diketahui kadar protein enzim dengan menggunakan metoda lowry dan BSA sebagai standar.

Dari kurva standar BSA yang dilakukan, maka didapat kadar protein enzim sebesar 1038 mg/l. Kadar protein yang didapatkan cukup besar.

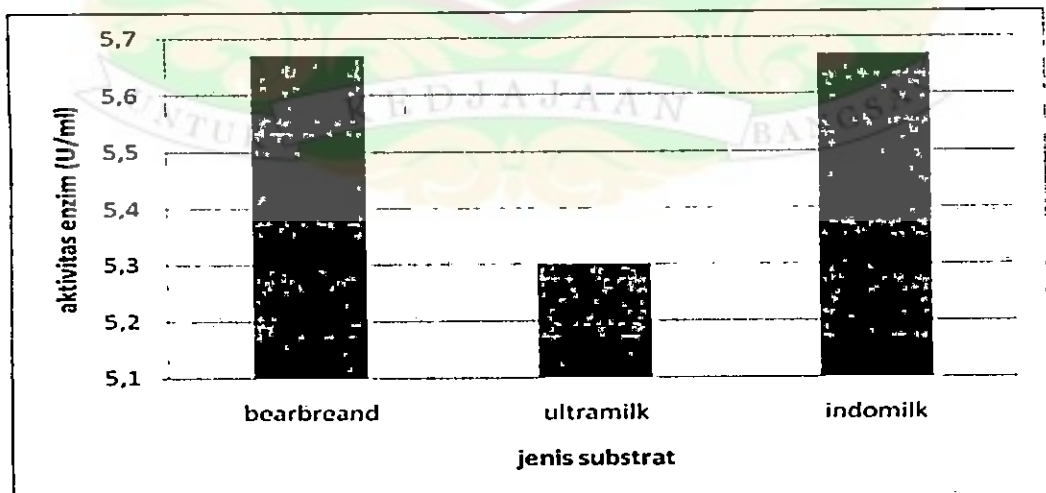
4.7. Efek Variasi Substrat Pada Aktivitas Protease

Tujuan dari pengujian isolat dengan menggunakan berbagai jenis substrat adalah untuk mengetahui substrat mana yang paling cocok untuk menghasilkan enzim protease semaksimal mungkin.



Gambar 12. Grafik yang menunjukkan variasi jenis substrat pdatan dengan aktivitas enzim

Setiap enzim hanya dapat bekerja pada substrat tertentu karena enzim mempunyai spesifitas substrat yang tinggi. Pada konsentrasi substrat yang rendah maka aktivitasnya juga rendah dan aktivitas enzim akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Namun bila telah tercapai suatu titik optimum sehingga jika melampaui titik optimum itu maka akan menunjukkan peningkatan yang kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat atau akan berkurang.



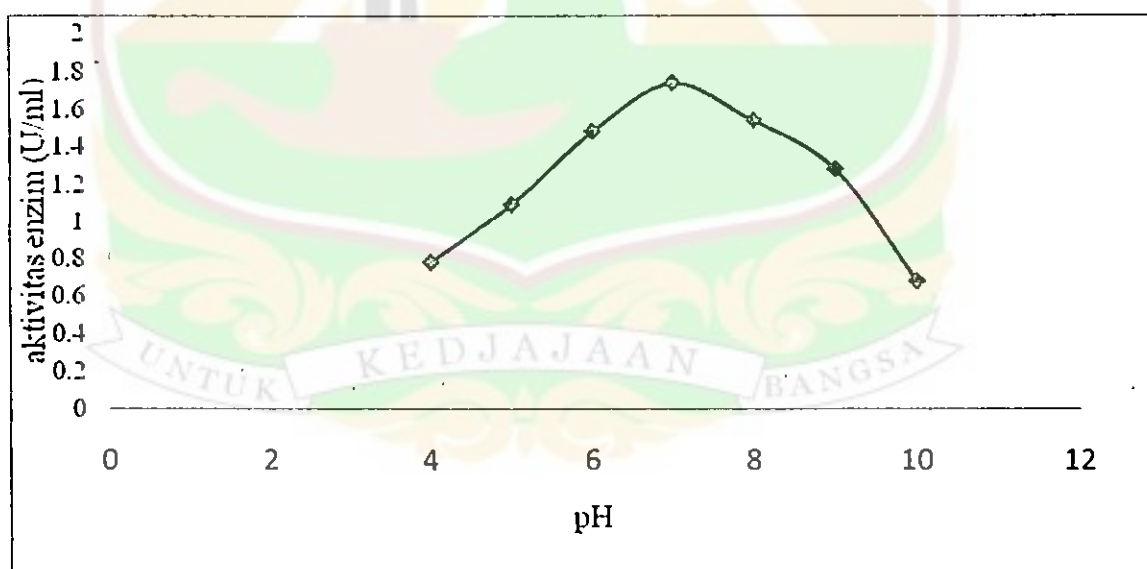
Gambar 12. Grafik yang menunjukkan variasi jenis substrat dengan aktivitas enzim

Dari gambar diatas terlihat bahwa substrat kasein mempunyai aktivitas enzim yang paling tinggi dengan nilai aktivitas enzim sebesar 7,43 U/ml. Kemudian diikuti oleh Bearbrand dan indomilk dengan nilai aktivitas enzim 5,354 U/ml, ultramilk dengan nilai aktivitas enzim 5,005 U/ml. Dan nilai aktivitas enzim terendah ditunjukkan oleh substrat susu skim senilai 2,616 U/ml.

Kasein memberikan aktivitas enzim tertinggi karena kadar protein pada kasein lebih tinggi dibandingkan dengan jenis susu yang lain. Kasein merupakan komponen utama susu. Kasein sering disebut protein susu. Oleh sebab itu aktivitas enzim akan besar dengan substrat enzim bila dibandingkan dengan jenis substrat yang lain.

4.8. Efek pH Pada Aktivitas Protease

Dalam penentuan pH optimum protease ditentukan dengan kasein 1% (w / v) sebagai substrat terlarut dalam buffer berbeda (buffer asetat pH 4 dan 5, Buffer fosfat pH 6 dan 7.0, pH 8 dan 9 digunakan buffer borat . Hasil pengukuran dapat terlihat pada gambar 12.



Gambar12. Kurva aktivitas enzim vs pH

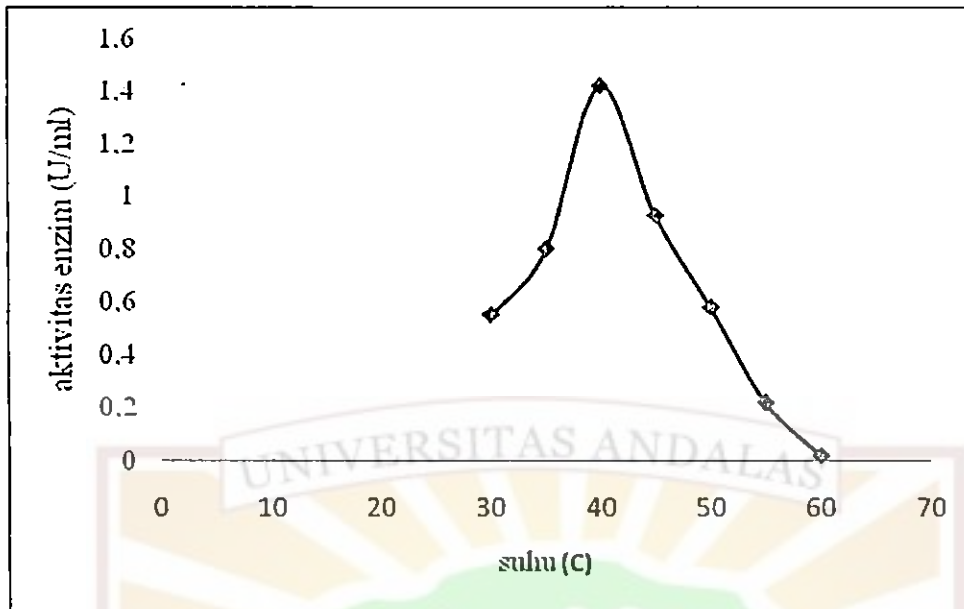
Dari gambar 13 terlihat bahwa aktivitas enzim optimum pada pH 7 dengan aktivitas enzim sebesar 1,8 U/ml. Hasil pH optimum ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Marate, M.Y, dkk.

Pada pH yang bukan pH optimumnya, aktivitas enzim akan turun. Hal ini disebabkan, pada pH yang bukan pH optimumnya akan mempengaruhi struktur 3 dimensi enzim. Jika struktur enzim berubah maka sisi aktif yang akan berikatan dengan substrat juga berbeda yang mengakibatkan aktivitasnya menurun.

4.9. Efek Suhu Pada Aktivitas Protease

Suhu optimum untuk aktivitas protease diuji pada suhu yang berbeda 30 sampai 60 °C menggunakan kasein sebagai substrat dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7. Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim, dimana dengan meningkatnya suhu maka aktivitas enzim juga meningkat. Pada suhu di atas atau di bawah suhu optimum maka aktivitas protease akan berkurang.

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat.



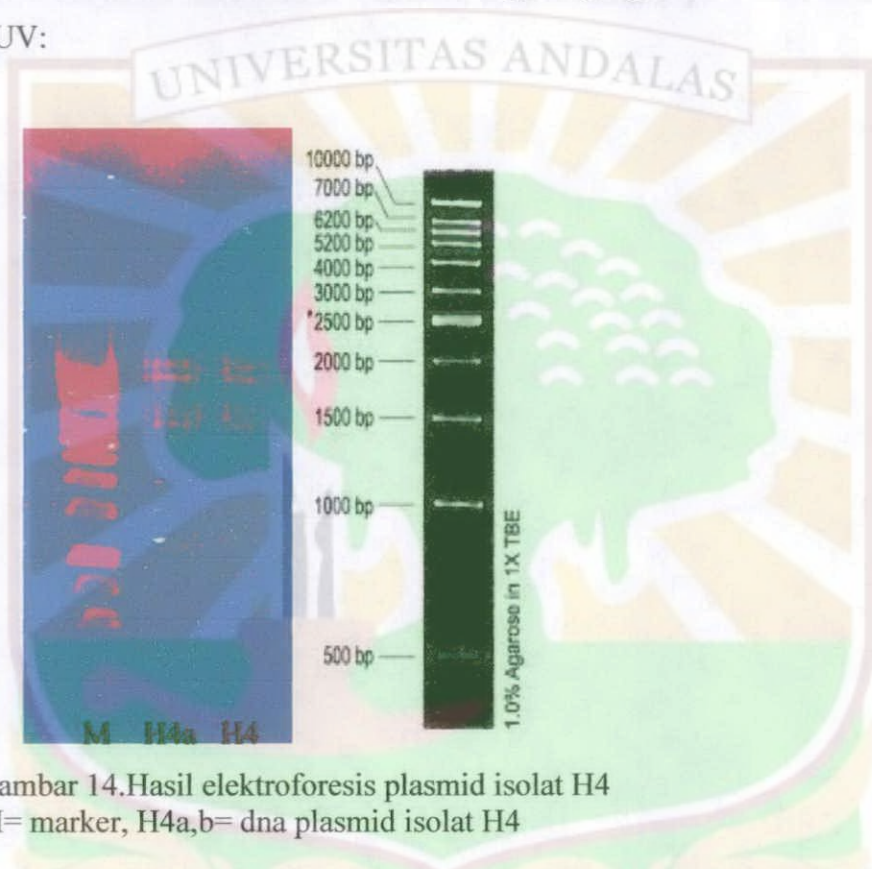
Gambar12. Kurva aktivitas enzim vs suhu

Dari grafik diatas terlihat bahwa enzim akan berkerja maksimum pada suhu 40 C. Setelah suhu 40 C, aktivitas enzim akan turun karena protein pada enzim mulai mengalami denaturasi. Pada suhu yang sangat rendah, enzim tidak benar-benar rusak tetapi aktivitasnya sangat banyak berkurang. Dengan bertambahnya suhu dapat mengakibatkan aktivitas enzim meningkat. Saat suhu meningkat, proses denaturasi semakin lama merusak reaksi aktif dari molekul enzim. Ketika temperatur meningkat, proses denaturasi juga mulai berlangsung dan menghancurkan aktivitas molekul enzim. Pada suhu rendah aktivitas enzim berlangsung secara lambat.

4.10. Isolasi Plasmid

Plasmid mengkode gen-gen yang mensintesis bakteriosin. Sehingga dengan mengisolasi plasmid kita akan mengetahui mapping (pemetaan) gen pengkode bakteriosin dan juga gen yang lainnya

Hasil dari elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 volt dilihat dengan sinar UV:



Gambar 14. Hasil elektroforesis plasmid isolat H4
M= marker, H4a,b= dna plasmid isolat H4

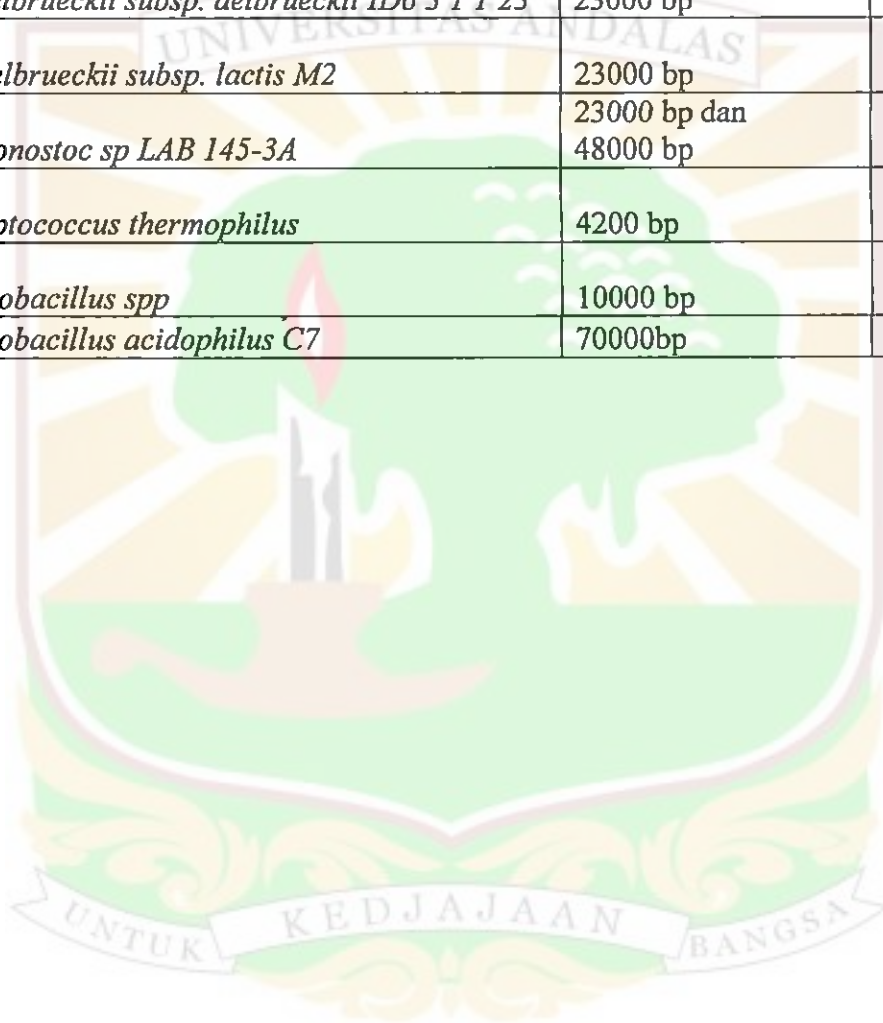
Hasil elektroforesis DNA plasmid (gambar 14) menunjukkan pita-pita yang tebal dan *smear*, berarti dalam penelitian ini menghasilkan isolasi DNA plasmid yang belum murni.

Hasil elektroforesis yang dilakukan dapat diketahui ukuran DNA sampel melalui persamaan garis yang diperoleh dari DNA marker. Ukuran plasmid yang didapatkan sebesar 2000 bp.

Berikut ini Data ukuran plasmid yang telah diisolasi dari beberapa bakteri asam laktat (BAL) -

Tabel 2. Data ukuran plasmid dari BAL yang telah diisolasi

Nama BAL	Ukuran plasmid	keterangan
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3000 bp	Jurnal no 20
<i>Bacillus sp1</i>	7000 bp	Jurnal no 21
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii ID6 3 1 1 23</i>	23000 bp	Jurnal no 22
<i>L. delbrueckii subsp. lactis M2</i>	23000 bp	Jurnal no 22
<i>leuconostoc sp LAB 145-3A</i>	23000 bp dan 48000 bp	Jurnal no 23
<i>Streptococcus thermophilus</i>	4200 bp	Jurnal no 27
<i>Lactobacillus spp</i>	10000 bp	Jurnal no 27
<i>Lactobacillus acidophilus C7</i>	70000bp	

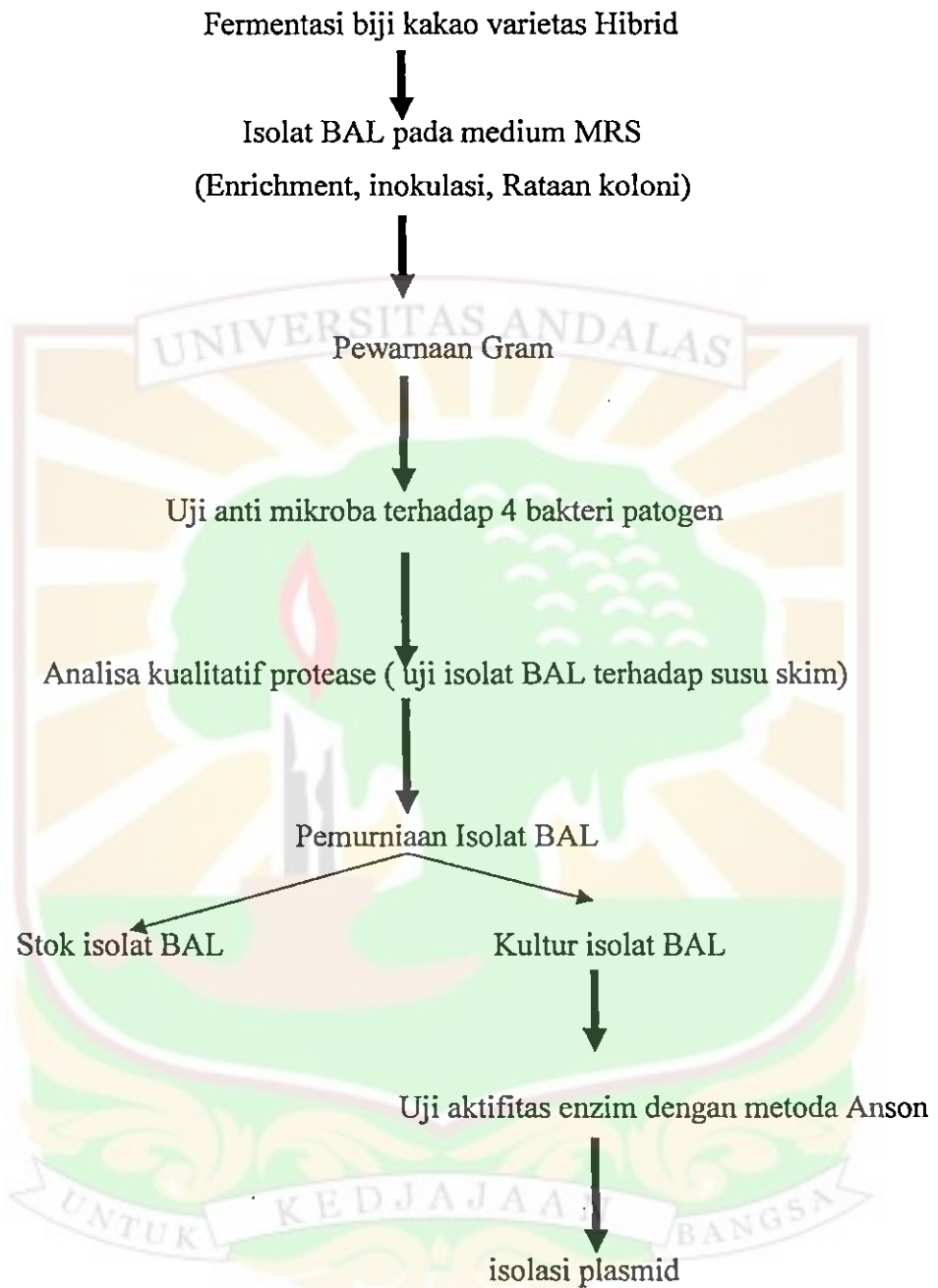


DAFTAR PUSTAKA

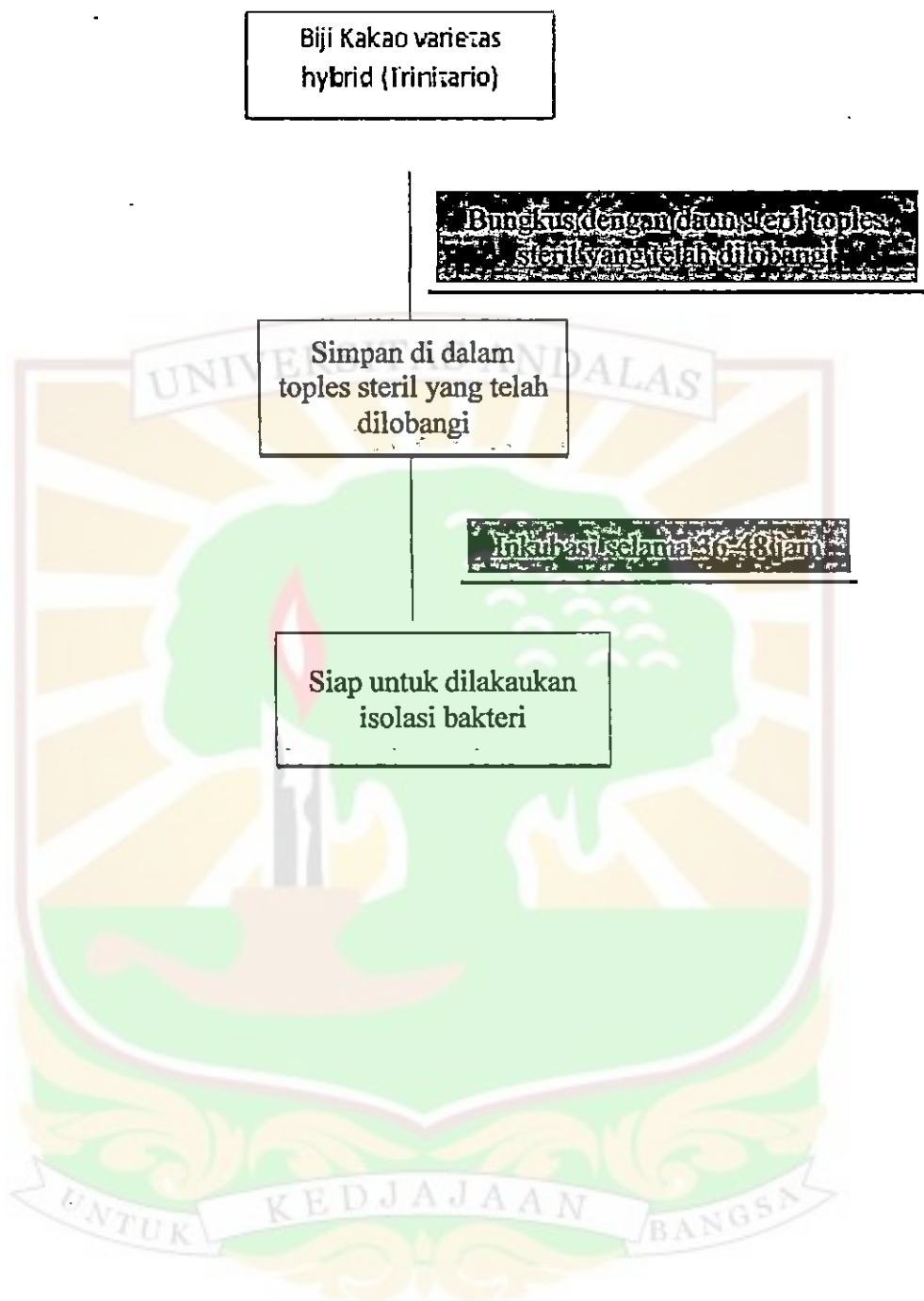
1. Ekspo Kadis Dinas Perkebunan Pemerintah Propinsi Sumatera Barat. Pengembangan Kakao di Sumatera Barat Menuju Sentra Produksi Indonesia Bagian Barat Tahun 2010. 29 juni 2006.
2. Ardhana, Made M. 2002. The Microbial Ecology of Cacao bean Fermentation in Indonesia. *International Journal of food Microbiology* 86 (2003) 87-99.
3. Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A.S., 2001. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC, pp. 721–736.
4. Afrianto, E., dan E. Liviawaty. 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta. 125 hlm.
5. Ali. G.R.R. and S. Radu. 1998. *Isolation and Screening of Bacteriocin Producing LAB from Tempeh*. University of Malaysia
6. Rostini, Iis. Peranan Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus plantarum*) terhadap Masa Simpan Filet Nila Merah pada Suhu Rendah. Tesis Master Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan Universitas Padjajaran. Jatinangor. 2007.
7. Carl E Hansen, Margarita del Olmo and Christine Burri. 1998. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. *J Sci Food Agric*: 77, 273–281.
8. Feliatra, Irwan Efendi. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan*. Jurnal Natur Indonesia . Pekanbaru. 2004.
9. Haryanto, R. *Antara Antibiotik, Probiotik dan Prebiotik*. Asisten mobil lab Basic Science Center ITB, Bandung. 2005.
10. Jamsari. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press. Riau. 2007
11. Komang, W.G. *Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba*. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor (2005).
12. Purwati, Endang. *Pemanfaatan Blondo VCO sebagai Sumber Protein*. Seminar Penyuluhan Petani Kelapa. Kota Pariaman. 29 November 2004

13. Purwati, Endang. Husmaini. S. Syukur, Y. Murni, F. Othman, *Lactobacillus sp. Isolasi dari Blondo Virgin Coconut Oil Efektif sebagai Probiotik, pada Prosiding Badan Kerja Sama Universitas Wilayah 3. Jambi, 26-28 April 2006.*
14. Purwati, Endang. S. Syukur, Z. Hidayat. *Lactobacillus sp. Isolasi dari Biovicophitomega sebagai Probiotik.* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta. 24 -25 Januari 2005.
15. Suryani, Dinie, Zulfebriansyah, Komoditas Kakao : Potret dan Peluang Pembiayaan. *Economic Review* : 210 . Desember 2007.
16. Unus, S. *Mikrobiologi Dasar.* Papas Sinar Sinanti. Jakarta 2005.
17. Lowry OH, Rosenbrought NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagen.* *J.Biol .Chem.*193: 265-275.
18. Fardiaz,S, Triana, A dan Rahayu, W.P. *Aktivitas antimikroba bumbu segar Hasil Olahan industri terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Makanan.* *Jurnal Ilmu dan Tek.Pangan.* Vol 3(2):1.1998.
19. Marathe,M.Y., Ghost,J.S. *Study of proteinase activity of Lactobacillus plantarum NCIM 2083.* *International Journal of Genetics and Molecular Biology* Vol. 1 (1), pp. 001-005, April, 2009.
20. Amjad B. Khalil, Ghandi H. Anfoka, and Salwa Bdour. *Isolation of plasmids present in thermophilic strains from hot springs in Jordan.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 239–241, 2003.
21. Soomro,A.H, and Masud.,T. *Protein Pattern and Plasmid Profile of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi, A Traditional Fermented Milk Product of Pakistan.* *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4) 447–453 .2007.
22. Choi, yeon-ok and cheol ahn. *Plasmid associated bacteriosin production by leuconostoc sp LAB 145-3A Isolated from Kimchi.* *Journal of Microbiology and Biotechnology.* Vol 7.No.6,409-416, 1997.
23. Byline,Deog Yong Lee , Yeon-Soo Seo , Nabin Rayamajhi , Mi Lan Kang, Su In Lee , Han Sang Yoo . *Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of Lactobacillus reuteri from pig feces.*

Lampiran 1. Skema Kerja

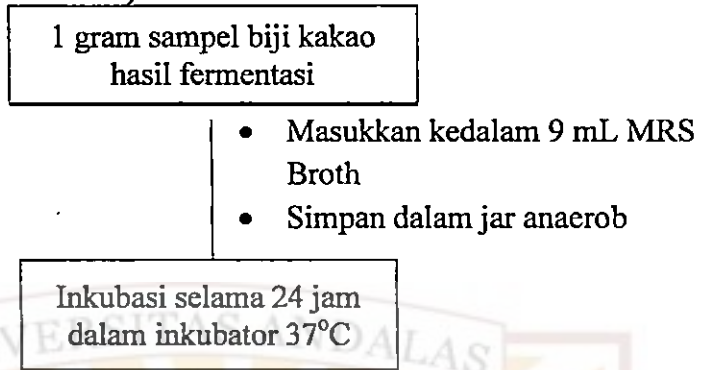


Lampiran2. FERMENTASI KAKAO

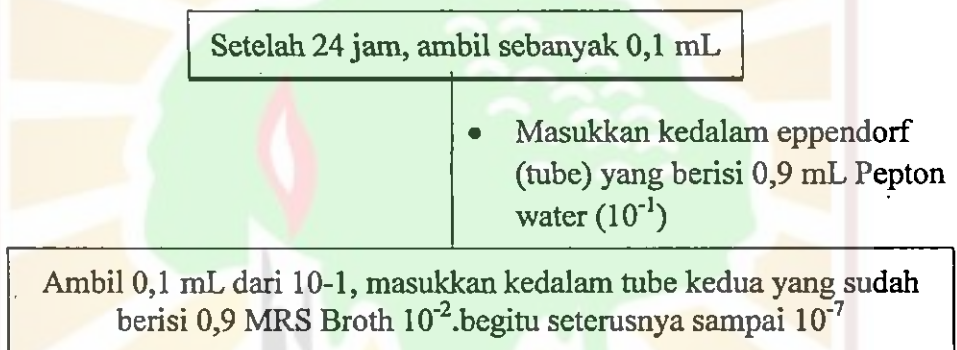


Lampiran3. ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT

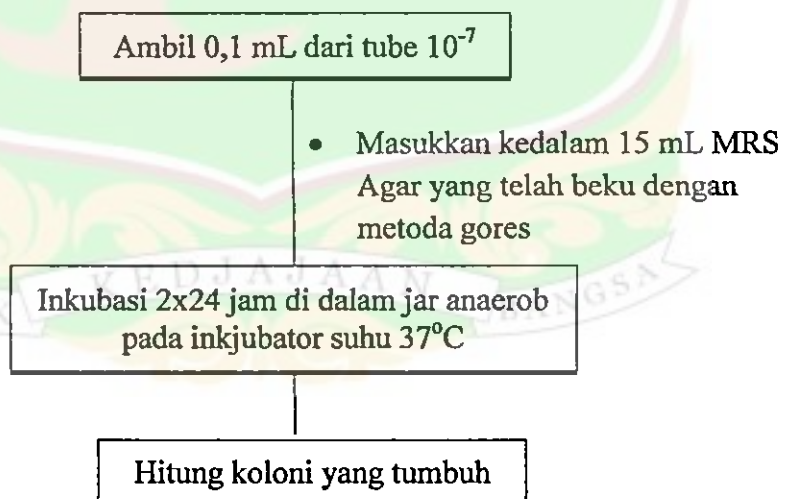
1. Proses Pengkayaan(*Enrichment*)



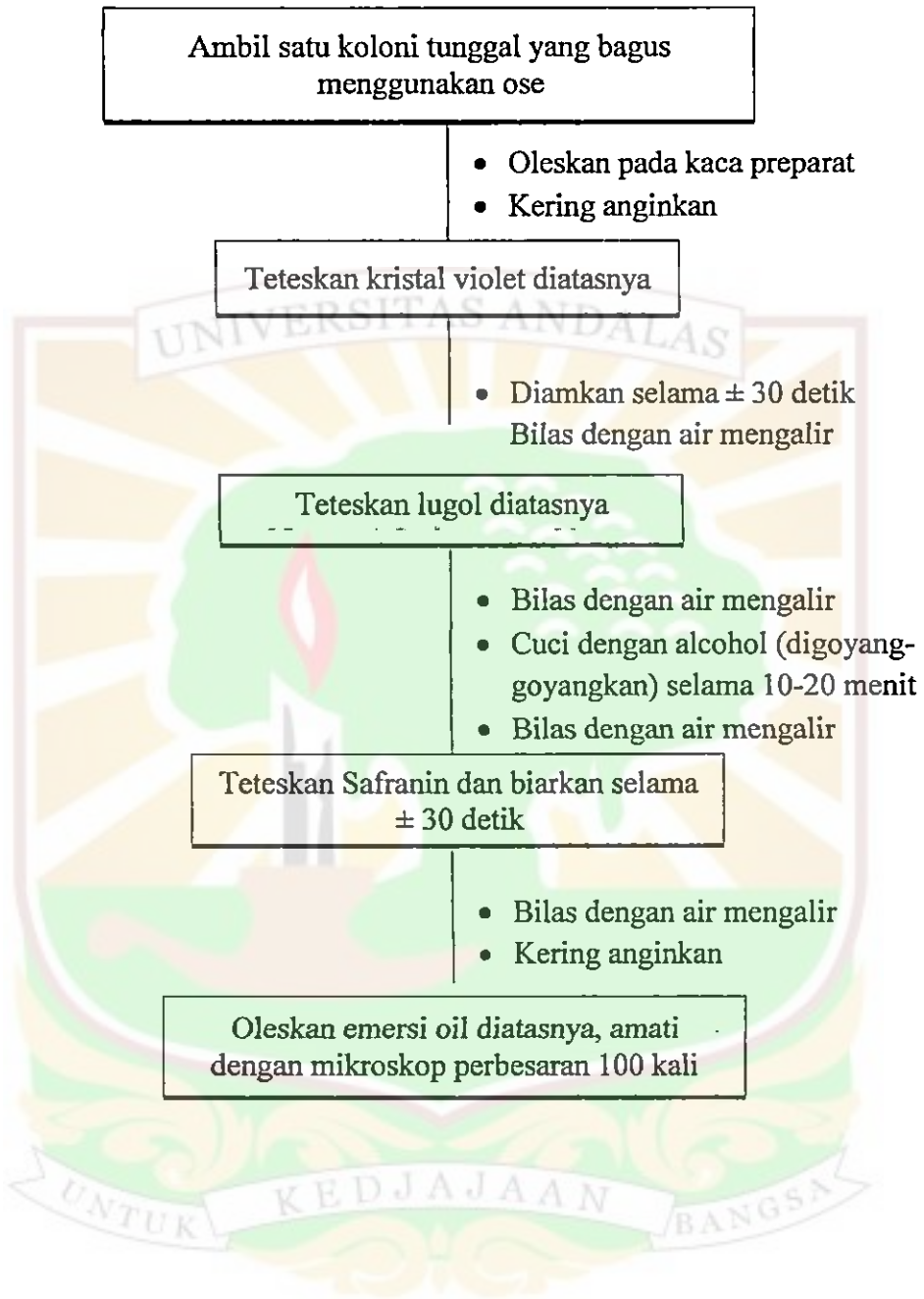
2. Proses Pengenceran (*Serial Delution*)



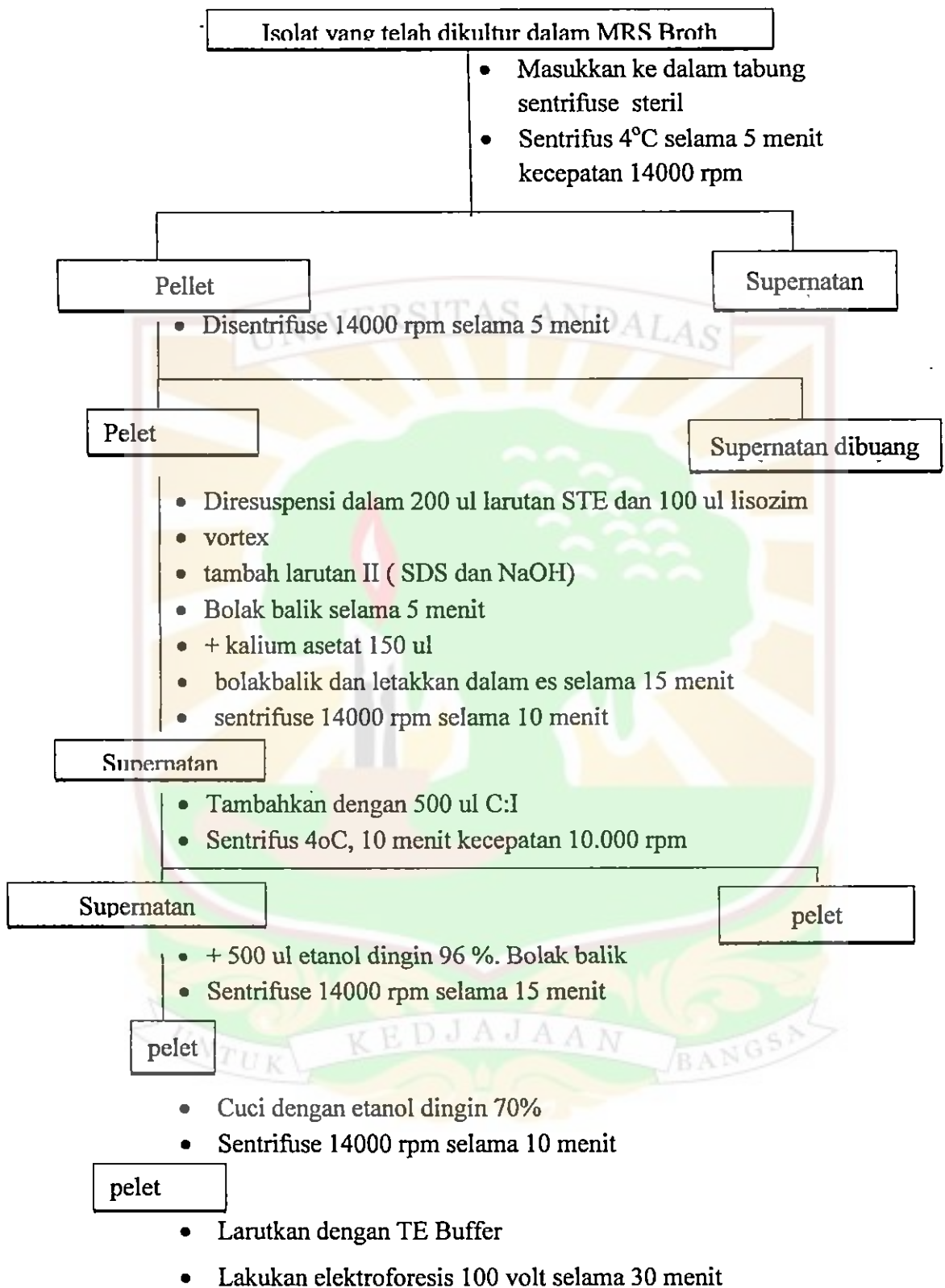
3. Proses Penanaman (*Planting*)



Lampiran4. Pewarnaan Gram



Lampiran 5. ISOLASI PIASMID



Lampiran 6. Komposisi media

A. MRS agar (De Mann Rogossa Sharpe)

formula	gram/liter
Dextrose	20.00
Bacteriological Peptone	10.00
Beef extract	8.00
sodium acetat	5.00
Yeast Extract	4.00
Dipottassium Phosphate	2.00
Ammonium Citrate	2.00
Tween	801.00
Magnesium Sulfate	0.20
Manganese Sulfate	0.50
Bacteriological Agar	10.00
PH = 6,2 + 0,2 pada suhu 25 C	

B. MRS Broth

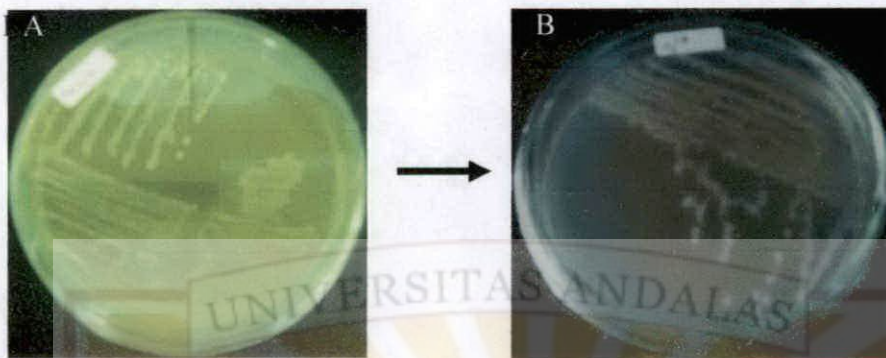
Formula	
Dextrose	20.00
Bacteriological Peptone	10.00
Beef extract	8.00
sodium acetate	5.00
Yeast Extract	4.00
Dipottassium Phosphate	2.00
Ammonium Citrate	2,00
Tween 80	1.00
Magnesium Sulfate	0.20
Manganese Sulfate	0.05

C. Nutrien Agar	Gram/Liter
Formula	
Dextrose	20,00
Bacteriological Agar	15,00
Beef Extract	15,00
Peptone	5,00



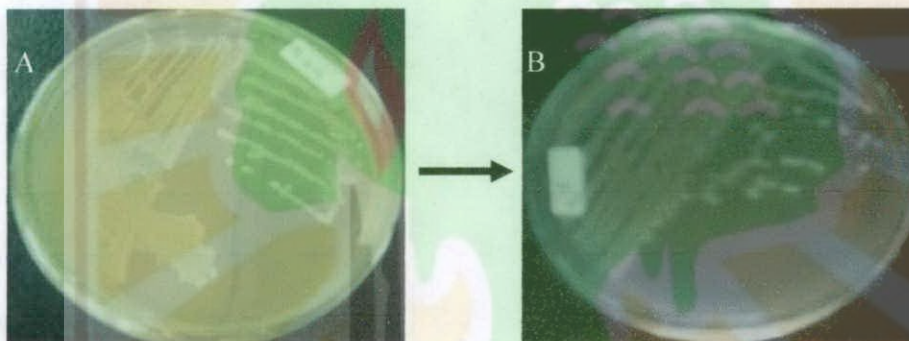
Lampiran 7. Pemurniaan isolat

Dari isolasi bakteri BAL yang telah dilakukan, didapatkan 8 isolat. Berikut ini merupakan hasil pemurniaan isolat tersebut



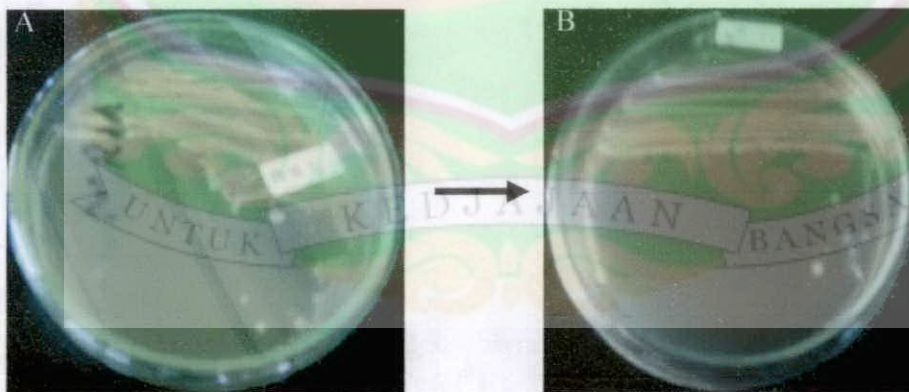
Gambar hasil pemurniaan isolat H1
A merupakan pemurniaan 1

B merupakan pemurniaan ke2



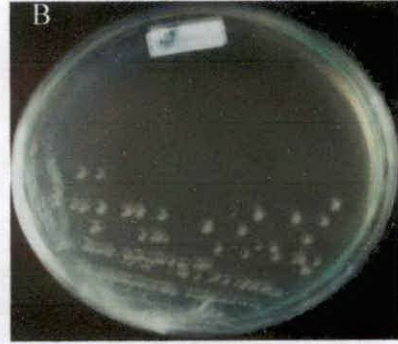
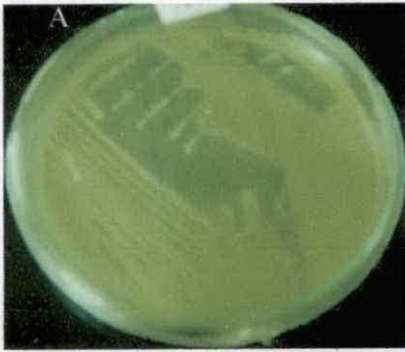
Gambar hasil pemurniaan isolat H2
A merupakan pemurniaan 1

B merupakan pemurniaan ke2



Gambar hasil pemurniaan isolat H3
A merupakan pemurniaan 1

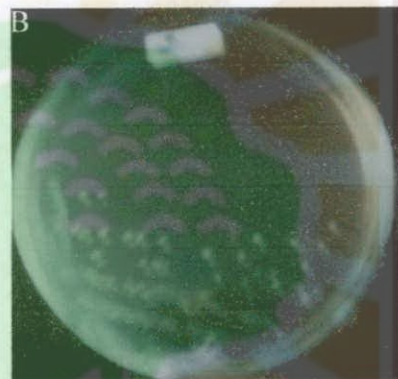
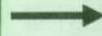
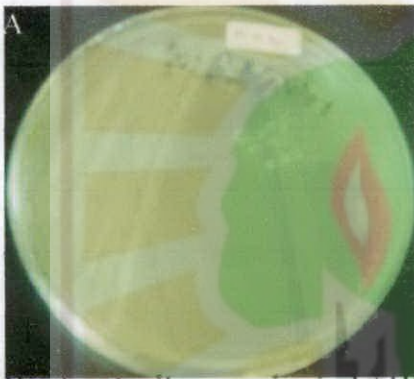
B merupakan pemurniaan ke2



Gambar hasil pemurnian isolat H4

A merupakan pemurnian 1

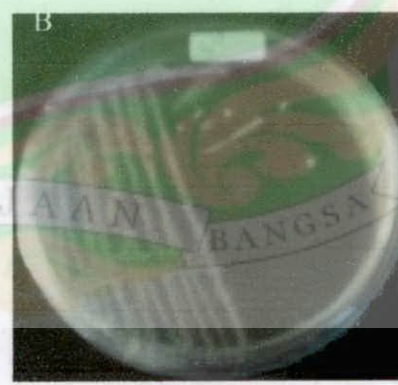
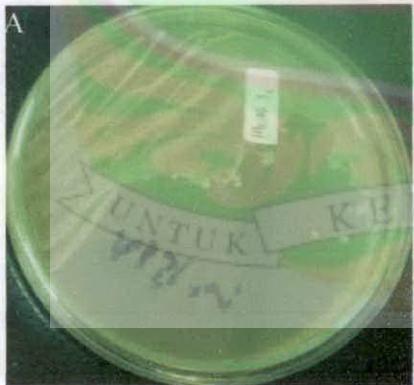
B merupakan pemurnian ke2



Gambar hasil pemurnian isolat H5

A merupakan pemurnian 1,

B merupakan pemurnian ke2



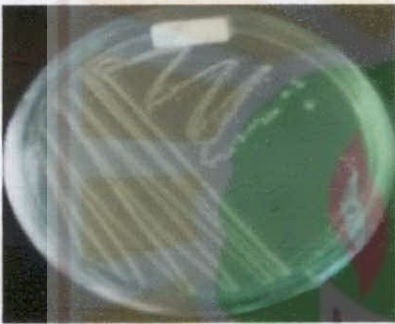
Gambar hasil pemurnian isolat H6

A merupakan pemurnian 1

B merupakan pemurnian ke2



Gambar hasil pemurnian ke-2 isolat H7

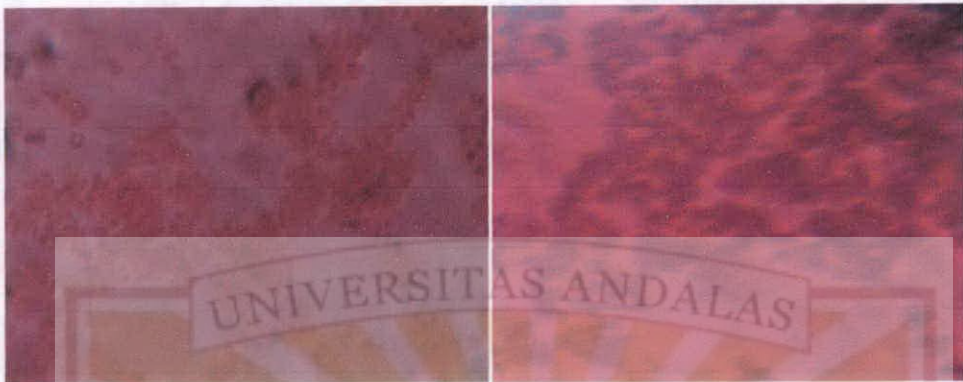


Gambar hasil pemurnian ke-2 isolat H8



Lampiran 8. Hasil pewarnaan gram

Berikut ini merupakan hasil pewarnaan dari ke-8 isolat bakteri asam laktat (BAL)



Gbr. pewarnaan gram isolat H1

Gbr. Pewarnaan gram isolat H2



Gbr. Pewarnaan gram isolat H3

Gbr. Pewarnaan gram isolat H4

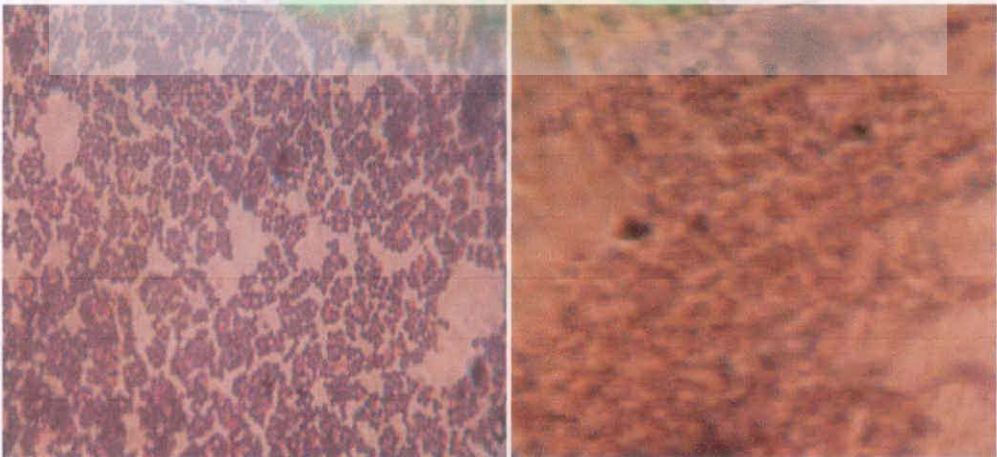


Gbr. Pewarnaan gram isolat H5

Gbr. Pewarnaan gram isolat H6



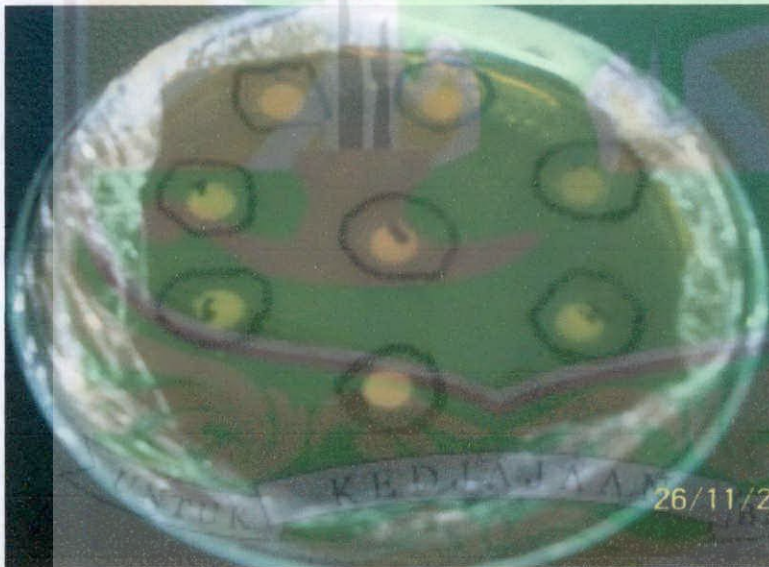
Gbr. Pewarnaan gram isolat H7



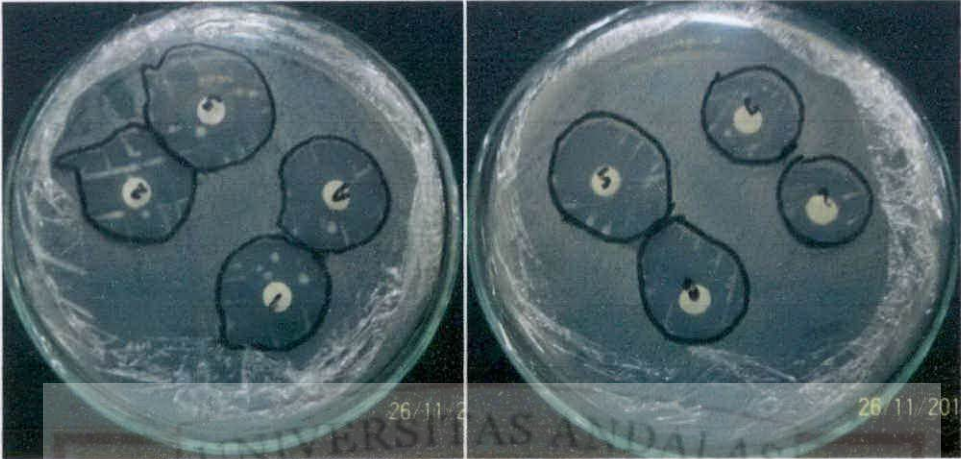
Lampiran 9. Data uji antimikroba



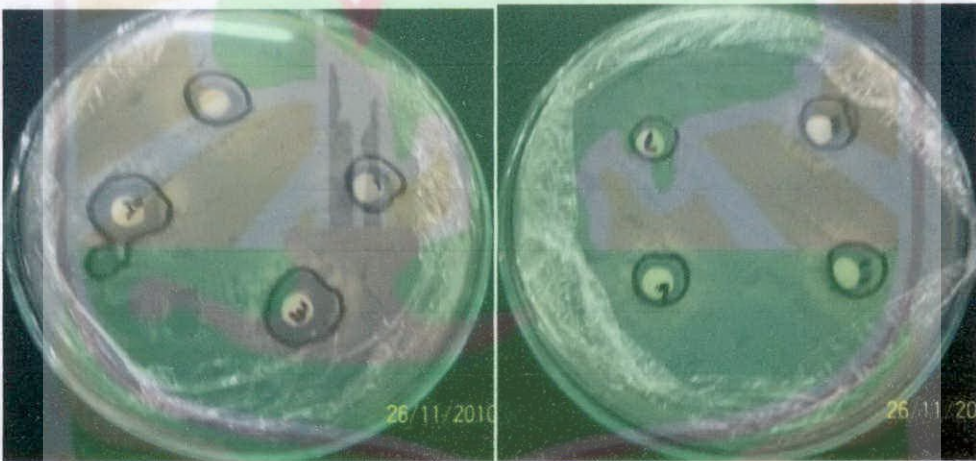
Hasil uji antimikroba ke-8 isolat terhadap bakteri *E.coli*



Hasil uji antimikroba isolat terhadap bakteri *Pseudomonas sp*



Hasil uji antimikroba semua isolat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*



Hasil uji antimikroba semua isolat terhadap bakteri *Streptococcus sp*

Lampiran 10. Data pengamatan zona bening pada bakteri *staphylococcus aureus*

Tabel 2. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

isolat	<i>Staphylococcus aureus</i>														
	24JAM				RATA2	48 JAM				RATA2	72JAM				RATA2
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
H1	2.3	2.8	2.2	2.2	2.375	2.2	2.6	2.2	2.1	2.275	2.2	2.1	2.2	2.3	2.200
H2	2.4	3.0	2.4	2.6	2.6	2.3	2.4	2.8	2.4	2.475	2.2	2.9	2.3	2.3	2.425
H3	2.7	2.7	3.0	2.7	2.7	3.0	2.5	2.9	2.6	2.750	2.9	2.9	2.6	2.9	2.825
H4	2.4	2.2	2.5	2.3	2.3	2.4	2.3	2.4	2.3	2.350	2.4	2.2	2.4	2.3	2.325
H5	2.8	2.2	2.4	2.4	2.45	2.2	2.8	2.5	2.3	2.450	2.7	2.3	2.2	2.7	2.425
H6	2.0	2.1	2.0	2.0	2.205	2.0	2.2	2.2	2.0	2.100	2.1	2.0	2.1	2.0	2.050
H7	1.8	1.9	1.8	1.8	1.825	2.5	2.2	1.9	2.0	2.100	1.8	1.8	1.8	1.9	1.825
H8	1.9	2.2	2.1	2.0	2.05	1.9	1.8	1.7	1.8	1.800	2.1	2.4	1.9	2.2	2.150

Lampiran 12. Data pengamatan zona bening pada bakteri *streptococcus sp*

Tabel 4. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri *streptococcus sp*

isolat	<i>Streptococcus sp</i>														
	24JAM				RATA2	48 JAM				RATA2	72JAM				RATA2
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
H1	1.2	1.2	1.2	1.1	1.175	1.2	1.1	1.1	1.4	1.20	1.2	1.2	1.2	1.3	1.225
H2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00	1.1	1.0	1.0	1.2	1.125	1.0	1.1	1.2	1.0	1.075
H3	1.6	1.5	1.5	1.5	1.525	1.3	1.6	1.5	1.4	1.425	1.5	1.3	1.3	1.5	1.400
H4	2.2	1.4	1.4	1.4	1.600	2.1	1.4	1.4	1.4	1.575	2.1	1.5	1.3	1.5	1.600
H5	1.0	1.1	1.0	1.2	1.05	1.0	1.0	1.0	1.1	1.025	1.0	1.0	1.0	1.2	1.05
H6	1.0	1.0	1.1	1.0	1.025	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	0.975
H7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.850	0.9	0.8	0.9	0.9	0.875	0.8	0.9	0.9	0.9	0.875
H8	1.0	1.1	1.2	1.0	1.075	1.0	1.0	1.1	1.0	1.025	1.1	1.1	1.1	1.1	1.10

Lampiran 13. Data pengukuran zona bening pada bakteri *pseudomonas sp*

Tabel 5. Pengamatan Zona Bening pada Bakteri *pseudomonas sp*

isolat	<i>Pseudomonas sp</i>														
	24JAM				RATA2	48 JAM				RATA2	72JAM				RATA2
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
H1	1.3	1.2	1.1	1.2	1.2	1.5	1.6	1.3	1.2	1.40	1.3	1.4	1.2	1.3	1.3
H2	1.5	1.6	1.3	1.4	1.45	1.2	1.3	1.2	1.2	1.225	1.2	1.2	1.2	1.3	1.225
H3	1.2	1.0	1.2	1.1	1.125	1.4	1.5	1.3	1.3	1.375	1.5	1.4	1.5	1.4	1.45
H4	1.1	1.2	1.1	1.1	1.125	1.2	1.2	1.1	1.2	1.175	1.3	1.4	1.4	1.4	1.375
H5	1.3	1.0	1.1	1.0	1.10	1.2	1.2	1.2	1.2	1.20	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
H6	1.0	1.0	1.1	1.2	1.075	1.2	1.2	1.2	1.2	1.20	1.1	1.4	1.2	1.3	1.25
H7	1.0	1.0	1.1	1.0	1.025	1.3	1.0	1.2	1.2	1.175	1.2	1.2	1.2	1.1	1.175
H8	1.1	1.2	1.2	1.2	1.175	1.2	1.2	1.0	1.0	1.150	1.3	1.5	1.3	1.4	1.375

Lampiran 14. Pengamatan aktivitas antimikroba

Tabel 6. Pengamatan Zona Bening pada semua bakteri patogen

isolat	INDEKS PENGHAMBAT (cm)											
	<i>E.coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Streptococcus sp</i>			<i>Pseudomonas sp</i>		
	24 JAM	48 JAM	72 JAM	24 JAM	48 JAM	72 JAM	24 JAM	48 JAM	72 JAM	24 JAM	48 JAM	72 JAM
H1	0.53	0.86	0.93	2.39	2.25	2.14	0.67	0.71	0.75	0.71	1.0	0.86
H2	0.53	1.0	0.96	2.71	2.53	2.46	0.43	0.61	0.53	1.07	0.75	0.75
H3	0.75	1.03	1.21	2.96	2.93	3.03	1.18	1.07	1.0	0.61	0.96	1.7
H4	0.96	1.0	1.07	2.36	2.36	3.32	1.28	1.25	1.28	0.61	0.71	0.96
H5	1.03	1.32	1.39	2.5	2.5	2.53	0.5	0.46	0.5	0.57	0.71	0.71
H6	1.75	1.57	1.5	1.89	2.0	1.93	0.46	0.43	0.39	0.53	0.71	0.78
H7	1.14	1.18	1.18	1.61	0.20	1.61	0.21	0.25	0.25	0.46	0.68	0.68
H8	1.1	1.07	1.07	1.93	1.57	2.07	0.53	0.46	0.57	0.68	0.64	0.96

➤ Diameter kertas cakram = 7 mm

Indeks Hambat = $\frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter isolat}}{\text{Diameter isolat}}$

Lampiran 15. Data Kalibrasi Standar BSA

konsentrasi (X) mg/l	absorban (Y)	XY	X ²
0	0.0	0	0
200	0.286	57.4	40000
400	0.510	204	160000
600	0.630	322.8	360000
800	0.903	722.4	640000
1000	1.079	1079	1000000
$\Sigma = 3000$	$\Sigma = 3.316$	$\Sigma = 2385.4$	$\Sigma = 22000000$

Persamaan Regresi

$$Y = A + BX$$

$$B = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6(2385.4) - (3000)(3.316)}{6(2200000) - (9000000)^2}$$

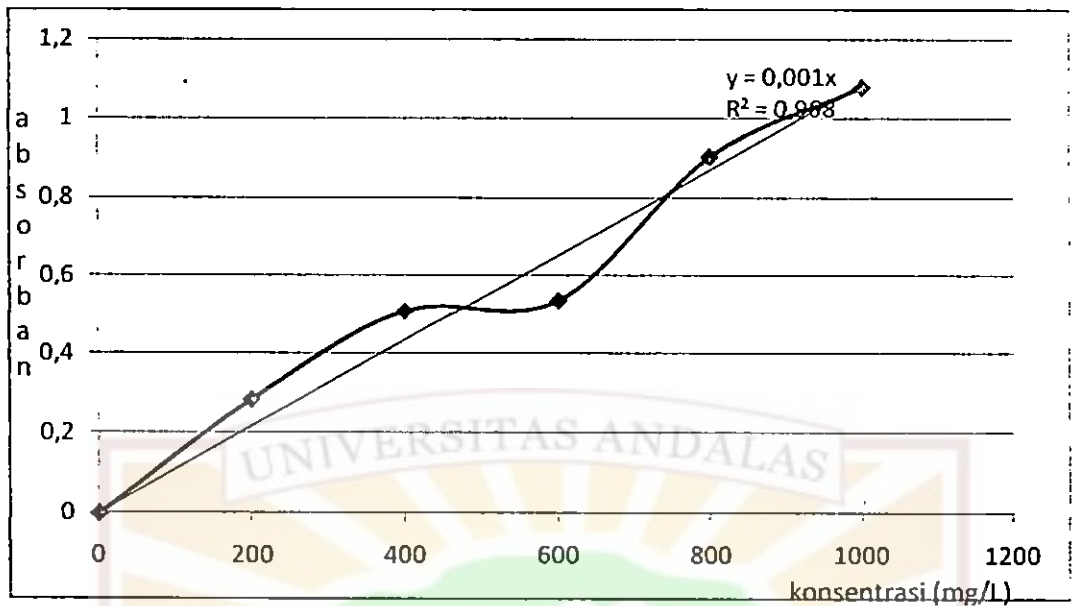
$$= 1,0 \times 10^{-3}$$

$$A = Y - BX$$

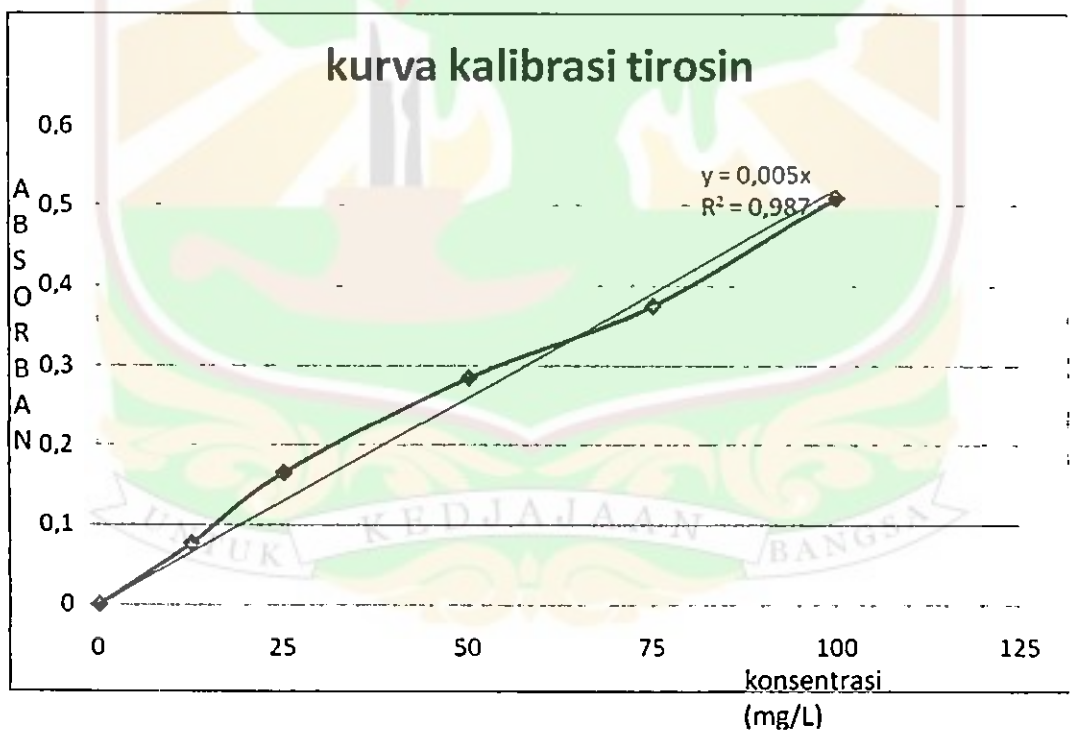
$$= 0.5527 - (1.0 \times 10^{-3})(500)$$

$$= 0.0527$$

Jadi persamaan regresinya adalah $Y = 0.0527 + 1.0 \times 10^{-3}X$



Kurva standar Bovine Serume Albumin



Kurva Standar Tirosin

Lampiran 16. Data Kalibrasi Standar Tirosin

konsentrasi (X) mg/l	absorban (Y)	XY	X ²
0	0.0	0	0
12.5	0.076	0.95	156.25
25	0.165	3.75	625
50	0.285	14	2500
75	0.375	22.75	5625
100	0.510	51	10000
Σ = 262	Σ = 1.386	Σ = 92.45	Σ = 18906

Persamaan Regresi

$$Y = A + BX$$

$$B = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6(92.45) - (262.5)(1.386)}{6(18906.25) - (262.5)^2}$$

$$= 5 \times 10^{-3}$$

$$A = Y - BX$$

$$= 0.231 - (5 \times 10^{-3})(43.75)$$

$$= 0.01225$$

Jadi persamaan regresinya adalah $Y = 0.01225 + 5 \times 10^{-3}X$

Lampiran 17 . Data Pengukuran aktivitas Enzim protease pada panjang gelombang 660 nm

A. Variasi Substrat

Substrat	Absorban 1	Absorban 2	Absorban 3
CASEIN	1.006	1.126	1.250
BEARBREND	0.870	0.851	0.869
INDOMILK	0.877	0.869	0.842
ULTRAMILK	0.825	0.810	0.788
SUSU SKIM	0.448	0.425	0.412

B. Variasi pH

pH	Absorban 1	Absorban 2	Absorban 3
4	0,174	0,156	0,144
5	0,201	0,210	0,213
6	0,272	0,258	0,269
7	0,316	0,290	0,314
8	0,266	0,286	0,274
9	0,247	0,223	0,237
10	0,155	0,164	0,121

C. Variasi Suhu

Suhu	Absorban 1	Absorban 2	Absorban 3
30	0.141	0.128	0.111
35	0.155	0.170	0.168
40	0.255	0.248	0.268
45	0.145	0.130	0.154
50	0.144	0.121	0.115
55	0.07	0.073	0.076
60	0.045	0.056	0.04

Lampiran 18. Tabel Perhitungan Aktivitas Enzim

a. Menurut Variasi Substrat

Substrat	A1	A2	A3	A _{rata-rata}	Aktivitas enzim (U/ml)
Kasein	1.006	1.126	1.250	1,127	7,43
Bearbrand	0.870	0.851	0.869	0,863	5,67
Indomilk	0.877	0.869	0.842	0,863	5,67
ultramilk	0.825	0.810	0.788	0,808	5,30
Susu skim	0.448	0.425	0.412	0,428	2,77

b. Menurut Variasi pH

pH	A1	A2	A3	A _{rata-rata}	aktivitas enzim (U/ml)
4	0,174	0,156	0,144	0,158	0,78
5	0,201	0,210	0,213	0,208	1,09
6	0,272	0,258	0,269	0,266	1,48
7	0,316	0,290	0,314	0,306	1,78
8	0,266	0,286	0,274	0,276	1,54
9	0,247	0,223	0,237	0,235	1,28
10	0,155	0,164	0,121	0,146	0,68

c. Menurut variasi Suhu

Suhu	A1	A2	A3	A _{rata-rata}	aktivitas enzim (U/ml)
30	0.141	0.128	0.111	0,127	0,765
35	0.155	0.170	0.168	0,164	1,01
40	0.255	0.248	0.268	0,257	1,63
45	0.145	0.130	0.154	0,143	0,87
50	0.144	0.121	0.115	0,127	0,765
55	0.07	0.073	0.076	0,073	0,405
60	0.045	0.056	0.04	0,047	0,232

Lampiran 19. Tabel Perhitungan Aktivitas spesifik enzim

a. Menurut Variasi Substrat

Substrat	aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik enzim (U/mg)
Kasein	7,43	7,016
Bearbrand	5,67	5,3 54
Indomilk	5,67	5,354
ultramilk	5,30	5,005
Susu skim	2,77	2,616

b. Menurut Variasi pH

pH	aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik enzim (U/mg)
4	0,78	0,737
5	1,09	1,029
6	1,48	1,398
7	1,78	1,680
8	1,54	1,454
9	1,28	1,208
10	0,68	0,642

c. Menurut variasi Suhu

suhu	aktivitas enzim (U/ml)	Aktivitas spesifik enzim (U/mg)
30	0,765	0,722
35	1,01	0,953
40	1,63	1,539
45	0,87	0,822
50	0,765	0,722
55	0,405	0,384
60	0,232	0,219