

ARTIKEL PENELITIAN

Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Diisolasi dari Kulit Buah Jeruk Jesigo (*Citrus nobilis* Lour.) Asal Kabupaten Limapuluh Kota yang Berpotensi Sebagai Probiotik

Reni Dwi Suri¹, Ade Djulardi², Endang Purwati³

1. Program Pasca Sarjana Bioteknologi Universitas Andalas, Padang; 2. Dosen Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang; 3. Guru Besar Bioteknologi/ Teknologi Hasil Ternak Universitas Andalas Padang

Korespondensi: Endang Purwati; purwati17@unsci.unand.ac.id

Abstrak

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi isolat bakteri asam laktat dari Limbah Kulit Buah JESIGO yang belum dimanfaatkan dan mengevaluasi potensi probiotik mereka. Setiap spesies bakteri asam laktat memiliki efek probiotik yang berbeda sehingga memerlukan seleksi dan identifikasi untuk mendapatkan strain probiotik yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui secara pasti bakteri asam laktat yang terkandung dalam limbah kulit buah JESIGO menggunakan uji biokimia dan dilanjutkan uji molekuler. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif eksploratif untuk mengetahui bakteri asam laktat tertentu yang terkandung dalam limbah Kulit Buah Jesigo. BAL dilakukan dengan menggunakan media isolasi selektif de Man ROGOSA Sharpe Agar. Seleksi dilakukan dengan mengamati morfologi dan pewarnaan gram. Selanjutnya dilakukan pengujian sifat biokimia dan jenis fermentasi. Untuk melihat potensinya sebagai probiotik, maka dilakukan uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan antibiotik sebagai kontrol. **Hasil:** Identifikasi bakteri asam laktat pada penelitian ini menggunakan metode identifikasi molekuler dengan gen penanda 16S rRNA. **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan BLAST, ditemukan bahwa jenis isolat bakteri fermentasi Limbah Kulit Buah JESIGO, kode sampel JR2, 99,86% mirip dengan *Pediococcus acidilactici*.

Kata kunci: Limbah kulit JESIGO, BAL, 16sRNA, Probiotik

Abstract

Objectives: The research aimed to isolate and identification of lactic acid bacteria isolates from JESIGO Fruit Peel Waste which has not been utilized and to evaluate their probiotic potency. Each species of lactic acid bacteria has a different probiotic effect that requires selection and identification to obtain a good probiotic strain. the purpose of this study was to determine with certainty the lactic acid bacteria contained in JESIGO Fruit Peel waste using biochemical tests and the molecular test continued. **Methods:** This research is qualitative descriptive exploratory to know for certain lactic acid bacteria contained in the waste Jesigo Fruit Peel. BAL was performed using selective isolation media de Man ROGOSA Sharpe Agar. Selection is done by observing the morphology and gram staining. Further

testing biochemical properties and fermentation type. To see the potential as a probiotic, an Anti-microbial activity test was carried out using antibiotics as a control. **Results:** The identification of lactic acid bacteria in this study used a method of molecular identification with a marker gene of 16S rRNA. **Conclusion:** Based on the results of the analysis using BLAST, it was found that the type of bacteria isolate fermentation of JESIGO Fruit Peel Waste, sample code JR2, was 99.86% similar to *Pediococcus acidilactici*.

Keywords: : JESIGO Fruit Peel Waste, Lactic Acid Bacteria, 16s rRNA, Probiotic

PENDAHULUAN

JESIGO (*Citrus nobilis* Lour.) Merupakan jeruk siam yang berasal dari Kecamatan Gunung Omeh, Kabupaten Limapuluh Kota, Provinsi Sumatera Barat. Pada umumnya buah jeruk hanya dimanfaatkan untuk keperluan konsumsi. Kulit jeruk biasanya dibuang begitu saja tanpa memperhatikan manfaat yang terkandung di dalamnya. Limbah kulit buah jesigo merupakan salah satu limbah dari industri produksi salad, selai dan minuman seperti sari buah, sari buah dan sirup.

Salah satu bagian buah jeruk yang belum dimanfaatkan secara maksimal adalah kulit jeruk. Kulit jeruk memiliki peluang untuk dikembangkan dalam industri pangan dan pakan. Kulit jeruk manis mengandung vitamin C, senyawa fenolik, flavonoid, flavon glikosida dan saponin (Wang et al., 2014). Limbah kulit jeruk mengandung 136 mg vitamin C, berbeda dengan buahnya yang hanya mengandung 71 mg vitamin C dan dapat diolah untuk menghasilkan produk yang bernilai tinggi dan dapat dimanfaatkan untuk keperluan kesehatan.

Saat ini, Limbah Kulit Buah JESIGO masih belum mendapatkan penanganan yang berarti. Karena pada umumnya Limbah Kulit Buah Jesigo dibiarkan begitu saja dan dibuang begitu saja di tempat sampah. Padahal kulit JESIGO mengandung karbohidrat, selulosa, dan glukosa, seperti

yang dinyatakan oleh kulit buah jeruk mengandung sejumlah besar mineral (kalsium, selenium, mangan, dan seng) dan vitamin (C, A, dan Kompleks) beberapa kali lipat dari pulp. Permasalahan yang sering dihadapi saat ini adalah bagaimana menangani limbah yang menumpuk, khususnya limbah kulit JESIGO.

Potensi Bakteri Asam Laktat (BAL) perlu diisolasi dan disaring, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi dan pemurnian DNA molekuler sehingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik untuk menjaga kesehatan total (Yunenshi et al., 2011). Potensi BAL yang telah dikarakterisasi dan diidentifikasi secara konvensional dan molekuler serta telah dipatenkan memiliki nilai yang tinggi untuk aplikasi di berbagai bidang ilmu pengetahuan. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Fermentasi Limbah Kulit Buah JESIGO diperlukan untuk mengetahui dan mendapatkan spesies BAL yang terkandung dalam fermentasi yang berpotensi sebagai probiotik.

METODE

Materi Penelitian

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, oven, hot plate, bunsen, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu ukur, tabung

eppendorf, erlenmeyer, kertas minyak, plat aluminium, inkubator, gelas objek, aluminium foil, vortisitas. , timbangan analitik, gelas ukur, gelas kimia, hockystick, pH meter, desikator, labu kjehdal, loop needle, slide, mikroskop, pengaduk magnet, Lamina Flow, penghitung quebeccolony, ujung pipet mikro, tabung anaerobik, pipet mikro, centrifuge, PCR (Bio-Rad my cycler™ thermal cycler, AS), hari pemuatan, pencetakan agarose, elektroforesis (Power Pac Basic™, AS), pengocok inkubator (Rocker NB-104).

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Limbah Kulit Buah Jesigo dari Kecamatan Gunung Omeh, Kabupaten Limapuluh Kota, Provinsi Sumatera Barat, dan bahan yang biasa digunakan dalam analisis kimia dan mikrobiologi seperti: 23.5 gram Plate Count Agar (PCA) / Biolife Italia, *Pepton Water (Biolife Italia)*, *de Mann Rogosa Sharpe (MRS) Broth (Merck)*, *de mann Ragosa Sharpe (MRS) Agar (Merck)*, spiritus biru, selenium, H₂SO₄, aquades, NaOH 30 %, indikator metil merah, benzene, hidrogen peroksida (H₂O₂), HCl, *Nutrient Agar*, aquades steril, alkohol, *crystal violet*, iodin, safranin, etanol, RNase, primer F dan R, dNTP, Taq Polymerase, buffer, *gel agarose*, TBE (Tris Boric EDTA), TAE (Tris Acid EDTA), *RedSafe*, Promega Kit Protocol, *listeria enrichment broth*, bakteri uji (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 dan *Staphylococcus aureus* ATCC

25923), lugol, *agarose*, *master mix* dan *DNA ladder* (Bioscience).

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dan analisa laboratorium yaitu identifikasi molekuler bakteri asam laktat dari JESIGO (*Citrus nobilis* Lour.) untuk mendapatkan isolat BAL yang berpotensi sebagai kandidat probiotik dan Penelitian menggunakan 3 perlakuan yang berbeda dengan waktu fermentasi yang sama yaitu JR1 (difermentasi selama 3 hari), JR2 (difermentasi selama 6 hari) dan JR3 (difermentasi selama 9 hari).

Fermentasi Limbah Kulit Jeruk JESIGO

Limbah Kulit Buah Jesigo setelah dibersihkan difermentasi selama 3, 6 dan 9 hari dalam kondisi anaerobik.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Isolat bakteri asam laktat bekasam dikultur dalam media De Man, Rogosa and Sharpe (MRS), broth media (Merck, Germany) dan ditanam pada media MRS agar (Merck, Germany) yang diinkubasi pada suhu 37°C dalam tabung anaerob selama 48 jam. Selanjutnya diamati sifat morfologi (bentuk dan warna), dan sifat biokimia (pewarnaan Gram, uji katalase dan jenis fermentasi) Phikunthong dan Yunchalard (2010).

Uji Anti Mikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi cakram dengan bakteri *Escherichia coli* O157, *Listeria*

monocytogenes, dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai bakteri uji. Satu mL kultur BAL dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf steril kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. 0,4 g media nutrisi disiapkan (menggunakan 20 g nutrient agar dalam 1000 mL air suling). Kemudian 0,2% koloni bakteri yang diperkaya ditambahkan ke media dan dibiarkan kultur. Strain uji yang disebutkan diuji untuk penghambatan. Kemudian, 50 μ L supernatan BAL dimasukkan ke dalam disk. Antibiotik yang diuji adalah ampicilin 40 μ L, dan kanamisin 30 μ L untuk kontrol dibandingkan dengan supernatan. Cawan petri yang digunakan kemudian diinkubasi secara anaerob pada suhu 37 ° C. Aktivitas antibakteri dinyatakan sebagai diameter zona hambat bening yang disebabkan oleh kontrol antibiotik dan supernatan BAL.

Identifikasi BAL menggunakan 16S rRNA

Ekstraksi DNA mikroba dilakukan dengan menggunakan Promega USA KIT. Sebanyak 1000 μ L koloni tunggal dari MRS broth yang mengandung isolat BAL dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf baru kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Kemudian pellet diambil, ditambah 480 μ L 50mM EDTA dan 120 μ L Lysozyme. Campuran diinkubasi dalam penangas air 37° C selama 60 menit kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang, peletnya diambil, kemudian ditambahkan larutan lisis inti 600 μ L dan dihomogenisasi. Setelah itu

campuran diinkubasi pada suhu 80 °C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan larutan RNase 3 μ L, dihomogenisasi, dan diinkubasi dalam air 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L larutan pengendapan Protein, vortex, diinkubasi dalam es selama 5 menit, kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan pelet dibuang, ditambahkan isopropanol 600 μ L dan dihomogenisasi, kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm. Kemudian pellet dan supernatan dikeluarkan, 600 μ L etanol 70% ditambahkan dan dihomogenisasi, dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Terakhir, pellet diambil dan diangin-anginkan selama 15 menit, kemudian direhidrasi dengan larutan rehidrasi 50 μ L selama 30 menit pada suhu 65°C.

Primer R (16S-1492R, Tm 47°C, 5'GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3) dan primer F (16S-27F, Tm 54,3 °C, 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) disiapkan pada 10pM konsentrasi. Primer diambil pada 90 μ L dH₂O + 10 μ L primer R dan F. Primer R dan F dilarutkan dalam buffer TE dengan konsentrasi 100 μ M.

Analisis Data Sekuensing

Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program perangkat lunak DNASTAR. Untuk analisis sequence alignment, urutan yang diperoleh dibandingkan dengan yang sudah disimpan diGeneBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool). Analisis filogenetik dilakukan dengan tool MEGA v7.0 dengan Maximum Likelihood dan algoritma kimura -2 mode.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Asam Laktat dari JESIGO

Tabel 1. Hasil Total Koloni Bakteri Asam Laktat JESIGO

Sample	Total Lactic Acid Bacteria Colonies ($\times 10^7$ CFU/g)
JR1	13
JR2	24
JR3	2

Hasil penelitian untuk total BAL fermentasi Kulit *JESIGO* JR1 adalah 13×10^7 CFU/g, JR2 adalah 24×10^7 CFU/g, dan JR3 2×10^7 CFU/g. Pada penelitian ini total koloni bakteri asam laktat tertinggi di peroleh pada fermentasi Kulit *JESIGO* selama 6 hari (JR2) yaitu 24×10^7 CFU/g.

Isolasi dan Identifikasi Morfologi Bakteri Asam Laktat

a. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Setelah BAL fermentasi Kulit *JESIGO* diisolasi, ditemukan 3 isolat BAL dengan

Total BAL dihitung dengan tujuan untuk mengetahui jumlah koloni BAL yang terdapat pada produk fermentasi berbahan limbah buah. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri asam laktat hasil fermentasi Limbah Kulit Buah *JESIGO* di Kabupaten Lima Puluh Kota dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini:

ciri-ciri berbentuk bulat, licin dan bewarna krem, permukaan cembung, mengkilat, dengan pinggiran koloni rata dan halus. Setelah itu, dilanjutkan dengan mengidentifikasi morfologi BAL yang diseleksi. Identifikasi dilakukan dalam penelitian ini secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan isolat BAL secara makroskopis terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengamatan Isolat BAL secara Makroskopis

Sampel	Warna	Bentuk Koloni	Ukuran	Permukaan
JR1	Putih-krem	Bulat	2,0	Licin
JR2	Putih-krem	Bulat	2,0	Licin
JR3	Putih-krem	Bulat	1,5	Licin

Pengamatan secara makroskopis meliputi (bentuk, ukuran dan warna) BAL ditemukan koloni bewarna putih krem, berbentuk bulat dan memiliki elevasi cembung dengan tepian licin pada media *MRS Agar*. Hal ini sesuai dengan penelitian

Purwati *et al.*, (2005) bahwa koloni BAL pada media *MRS Agar* bewarna putih krem. Ditambahkan oleh Delfahedah *et al.*, (2013) bahwa ditemukan beberapa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari buah sirsak yaitu dengan bentuk koloni bulat

dan bundar, tepian licin, elevasi cembung dan warna putih susu dan krem.

b. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan pada sampel fermentasi Kulit *JESIGO* JR1, JR2, dan JR3. Hasil uji pewarnaan gram didapatkan pada penelitian adalah gram positif (+) dengan dicirikan masing-masing isolat BAL menyerap zat warna ungu dari *crystal violet* dengan bentuk *Coccus* (Bulat).

Hal ini sesuai dengan Salminen, Wright dan Ouwehand (2004) menyatakan bahwa BAL merupakan bakteri anaerob fakultatif, gram positif, berbentuk batang atau bulat, tidak membentuk spora dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi karbohidrat (glukosa, fruktosa dan sukrosa). Hasil ini

menunjukkan bahwa isolat yang didapat merupakan BAL mempunyai dinding sel yang lebih tebal, sehingga pada pemberian *crystal violet* dinding sel dapat menyerap warna tersebut dan tidak hilang saat dibilas, hal ini disebabkan kemampuan permeabilitas dari dinding sel gram positif karena itu dapat diidentifikasi dengan pewarnaan gram.

c. Uji Katalase Bakteri Asam Laktat

Uji katalase dilakukan pada isolat BAL dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Hasil uji katalase isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* dapat dilihat pada tabel 3 adalah sebagai berikut.

Tabel 3. Uji Katalase isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Kabupaten Lima Puluh Kota

Isolat	Uji Katalase
JR1	-
JR2	-
JR3	-

Hasil pengamatan pada penelitian yang telah dilakukan pada ketiga isolat memiliki katalase negatif yang ditandai dengan tidak munculnya gelembung gas pada ulasan bakteri yang ditetesi H_2O_2 . Hasil pengamatan pada penelitian ini sesuai dengan Ibrahim, Fridayanti dan Delvia (2015) yang mengidentifikasi BAL dengan melakukan pengujian pada buah mangga, BAL menunjukkan hasil uji katalase yang negatif. Hal ini dikarenakan BAL tidak memproduksi enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air

dan oksigen dan berkaitan dengan kemampuan BAL yang hanya membutuhkan sedikit oksigen untuk hidup.

d. Uji Tipe Fermentasi Bakteri Asam Laktat

Tujuan pengujian ini adalah untuk menggolongkan BAL termasuk ke dalam kelompok homofermentatif atau kelompok heterofermentatif. Hasil pengujian tipe fermentasi pada isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* seperti terlihat pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Uji Gas isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* asal Kabupaten Lima Puluh Kota

Isolat	Homofermentatif	Heterofermentatif
JR1	+	-
JR2	+	-
JR3	+	-

Hasil penelitian yang didapatkan yaitu semua isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* merupakan bakteri tipe homofermentatif yaitu bakteri yang produk utamanya hanya asam laktat. Hal ini ditandai dengan tidak adanya gelembung gas pada tabung durham yang diletakkan di dalam media MRS *Broth* MERCK. Hal ini menandakan bahwa BAL yang ditemukan merupakan tipe fermentasi homofermentatif. BAL dengan tipe homofermentatif hanya menghasilkan asam laktat sebagai produk utama.

Hasil ini juga sejalan dengan pendapat Syukur dan Purwati (2013) yang menyatakan bahwa BAL homofermentatif melibatkan jalur *Embden Meyernof-Parnas* yaitu glikolisis yang menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO₂ dan menghasilkan

biomassa sel dua kali lebih banyak daripada BAL heterofermentatif.

Skrining BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Potensial Probiotik

a. Aktivitas Antimikroba

Skrining antimikroba bakteri asam laktat dapat dilihat dari kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus*, dan *Listeria monocytogenes*. Uji aktivitas antimikroba menggunakan metode sumur (*well*) dan kemampuannya dilihat dari zona bening yang terbentuk pada nutrisi agar yang telah diinfeksi dengan bakteri uji.. Proses skrining menggunakan metode sumur difusi. Diameter zona bening yang terbentuk pada masing-masing isolat BAL seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Diameter Zona Bening Uji Aktivitas Antimikroba (mm)

No.	Isolat BAL	Diameter Zona Bening (mm)		
		<i>Escherichia coli</i> O157	<i>S. aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>
1	JR1	12.31	8.24	4.15
2	JR2	15.24	11.15	4.13
3	JR3	10.31	8.13	3.36

Isolat BAL yang memiliki zona hambat terbesar pada *Escherichia coli* O157 dimiliki oleh isolat JR2 dengan diameter 15.24 mm, sedangkan terendah adalah JR3 yaitu 10.31 mm. Diameter zona

hambat terbesar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada isolat JR2 yaitu 11.15 mm, sedangkan terendah adalah JR3 yaitu 8.13 mm. Diameter zona hambat terbesar terhadap bakteri *Listeria*

monocytogenes yang memiliki zona hambat terbesar adalah isolat JR1 dengan diameter 4.15 mm, sedangkan terendah adalah isolat JR3 sebesar 3.36 mm. Menurut Kusmarwati dan Ninoek (2008), aktivitas daya hambat bakteri dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm

Isolat BAL kode sampel JR2 memiliki zona hambat terbesar yaitu dengan diameter 15.24 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* O157, diameter 11.15 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan diameter 4.13 terhadap bakteri *Listeria monocytogenes*. Sehingga isolat JR2 dilanjutkan pengujian antimikroba zona hambat terhadap bakteri patogen menggunakan antibiotik penisilin, kanamisin, dan ampisilin sebagai kontrol

positif. untuk dapat membandingkan zona hambat yang terbentuk pada bakteri uji patogen. Tujuan digunakan antibiotik penisilin, kanamisin, dan ampisilin disebabkan dalam penelitian ini bakteri uji patogen yang digunakan adalah bakteri Gram positif, dan antibiotik tersebut mampu berperan aktif dalam melawan bakteri Gram positif. Hal ini sesuai dengan pendapat Soleha (2015) menyatakan bahwa antibiotik penisilin merupakan antibiotik yang mampu melawan bakteri Gram positif dengan mekanisme menghambat sintesis dinding sel bakteri, termasuk dalam golongan betalaktam. Untuk mengetahui resistensi dan sensitifitas bakteri uji patogen menggunakan kontrol positif antibiotik. Hasil zona bening dapat dilihat tabel 6 dibawah ini.

Tabel 6. Diameter Zona Bening Uji Aktivitas Antimikroba Isolat JR2 dengan Antibiotik sebagai Kontrol Positif

Kode Sampel	Diameter Zona Bening (mm)		
	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
JR2	15.24	11.15	4.13
Ampisilin	13.26	15.24	7.18
Kanamisin	12.25	11.38	6.15
Penisilin	-	-	-

Data hasil penelitian pada Tabel 6 menunjukkan bahwa isolat BAL JR2 mampu menghambat ketiga bakteri uji patogen. Pada *Escherichia coli* O157 yaitu dengan diameter 15.24 mm, hampir sama dengan penelitian Ismail, Yulvizar dan Putriani (2017) tentang aktivitas antimikroba BAL isolat biji kakao fermentasi dengan bakteri uji *Escherichia*

coli O157, dimana didapatkan zona hambat BAL terhadap *Escherichia coli* O157 yaitu 15-17 mm. Pada *Staphylococcus aureus* yaitu dengan diameter 11.15 mm. Hasil penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian Ismail, Yulvizar dan Putriani (2017) tentang aktivitas antimikroba BAL isolat biji kakao fermentasi dengan bakteri

uji *Staphylococcus aureus* didapatkan daya hambat bakteri yaitu 12-15 mm.

Menurut Morales, Sierra, Mancilla, Paredes, Loyola, Gallardo dan Borquez (2003) aktivitas zona hambat dikelompokkan menjadi empat kategori yaitu: aktivitas lemah (<5mm), sedang (5–10mm), kuat (>10–20mm), sangat kuat (>20–30mm). Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa isolat BAL JR2 asal fermentasi Kulit *JESIGO* yang memiliki zona bening yang masuk kategori kuat terhadap kedua bakteri uji dan kategori lemah terhadap satu bakteri uji. Kriteria penting yang digunakan dalam memilih isolat BAL yang dijadikan sebagai agensia probiotik adalah kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik yang menjadi penghuni saluran pencernaan. Syarat lain yang perlu

dimiliki oleh bakteri probiotik adalah kemampuannya menghasilkan substansi antimikrobia.

b. Ketahanan Isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Terhadap pH Asam

Toleransi terhadap pH asam merupakan salah satu syarat penting suatu bakteri asam laktat untuk dikategorikan probiotik. Ketahanan terhadap asam lambung berkaitan dengan sifat probiotik yang penting untuk bertahan hidup di dalam lambung. Agar probiotik dapat bekerja secara efektif, perlu seleksi strain yang mampu bertahan pada kondisi asam. Uji ketahanan isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* terhadap asam dalam penelitian ini dilakukan pada pH 3. Hasil uji ketahanan isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* terhadap asam disajikan dalam Tabel 7.

Tabel 7. Ketahanan Isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Terhadap pH Asam

No	Sampel Isolat BAL	Jumlah Sel Bakteri (CFU/ml)		Viabilitas BAL (%)
		Kontrol	pH 3	
1	JR1	42 x 10 ⁸	6 x 10 ⁸	14.29
2	JR2	54 x 10 ⁸	11 x 10 ⁸	20.37
3	JR3	34 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	11.76

Tabel 7 menunjukkan bahwa kemampuan isolat BAL dari fermentasi Kulit *JESIGO* yang paling unggul adalah isolat BAL kode sampel JR2 dengan jumlah sel bakteri hidup kontrol (tanpa pengaturan pH 3) yaitu 54 x 10⁸ CFU/ml setelah diberikan pengaturan pH 3 dengan jumlah sel bakteri hidup 11 x 10⁸ CFU/ml menghasilkan viabilitas BAL paling tinggi 20.37%. Sedangkan untuk hasil yang terendah adalah isolat BAL kode sampel JR3 dengan jumlah sel bakteri hidup

kontrol (tanpa pengaturan pH 3) yaitu 34 x 10⁸ CFU/ml, setelah diberikan pengaturan pH 3 sel bakteri hidup 4 x 10⁸ CFU/ml, menghasilkan viabilitas BAL paling rendah 11.76%. Viabilitas BAL merupakan perbandingan jumlah sel hidup sebelum dan setelah diberikan pengaturan keasaman dinyatakan dalam bentuk %. Semakin tinggi persentasi yang dihasilkan menandakan semakin tahan bakteri tersebut terhadap pH rendah.

Hal ini didukung oleh Khuruna dan Kanawijaya (2007) menyatakan bahwa paparan pada kondisi yang sangat asam dapat mengakibatkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler hilangnya komponen-komponen intraseluler seperti Mg, K dan lemak dari sel, yang mampu menyebabkan kematian bakteri yang tidak tahan asam..Berdasarkan hasil pengujian ketahanan terhadap pH asam menunjukkan bahwa isolat BAL dengan kode sampel JR2 yang diisolasi dari fermentasi Kulit *JESIGO* berpotensi sebagai kandidat probiotik karena mampu tumbuh pada kisaran 11×10^8 pH asam.

c. Ketahanan Isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Terhadap Daya Tahan Garam Empedu

Tabel 8. Ketahanan Isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* Terhadap Garam Empedu

No	Sampel Isolat BAL	Jumlah Sel Bakteri (CFU/ml)		Viabilitas BAL (%)
		Kontrol	Oxgall 0.3%	
1	JR1	81×10^8	42×10^8	51
2	JR2	76×10^8	48×10^8	63
3	JR3	45×10^8	22×10^8	49

Tabel 8 menunjukkan jumlah bakteri yang hidup pada media dengan penambahan oxgall 0.3%. Kemampuan isolat BAL dari fermentasi Kulit *JESIGO* yang paling unggul adalah isolat BAL kode sampel JR2 dengan jumlah sel bakteri hidup kontrol (tanpa penambahan oxgall 0.3%) yaitu 76×10^8 CFU/ml setelah diberikan penambahan oxgall 0.3% dengan jumlah sel bakteri hidup 48×10^8 CFU/ml menghasilkan viabilitas BAL paling tinggi 63%. Sedangkan untuk hasil yang terendah adalah isolat BAL kode sampel JR3 dengan

Penelitian ini menguji isolat BAL yang diisolasi dari fermentasi Kulit *JESIGO* mampu hidup dalam usus yang mengandung konsentrasi garam empedu 0.3% dengan lama inkubasi 24 jam. Garam empedu 0.3% adalah konsentrasi yang tepat untuk pengujian ketahanan BAL terhadap garam empedu. Hal ini didukung oleh Gilliland (2000) menyatakan bahwa konsentrasi garam empedu 0.3% merupakan konsentrasi yang kritis nilai yang cukup tinggi untuk menyeleksi galur yang resisten terhadap garam empedu. Ketahanan isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* terhadap garam empedu merupakan syarat penting untuk probiotik seperti halnya ketahanan terhadap asam. Hasil uji ketahanan isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* terhadap asam disajikan dalam Tabel 8.

jumlah sel bakteri hidup kontrol (tanpa penambahan oxgall 0.3%) yaitu 45×10^8 CFU/ml, setelah diberikan penambahan oxgall 0.3% sel bakteri hidup yaitu 22×10^8 CFU/ml, menghasilkan viabilitas BAL paling rendah 49%. Semakin tinggi persentase yang dihasilkan menandakan semakin tahan bakteri asam laktat terhadap garam empedu.

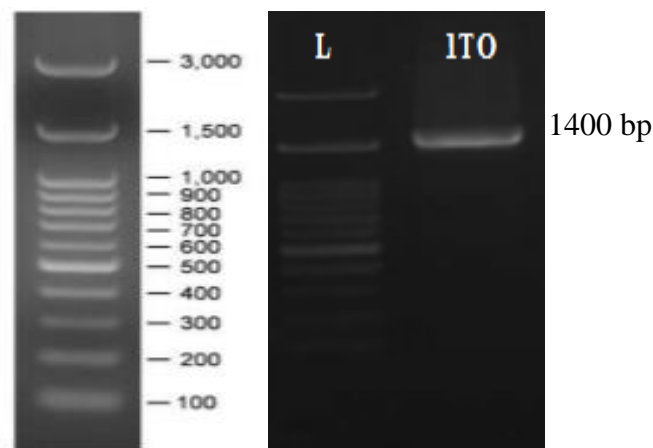
Hal ini sesuai dengan Bezkorovainy (2006) menyatakan bahwa ketahanan bakteri asam laktat terhadap garam empedu berkaitan dengan enzim *bile salt*

hidrolase (BSH) yang membantu menghidrolisa garam empedu terkonjugasi, sehingga mengurangi efek racun bagi sel. Berdasarkan hasil pengujian ketahanan terhadap garam empedu menunjukkan bahwa isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* dengan kode sample JR2 adalah yang paling unggul sebagai kandidat probiotik.

1. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dengan 16S rRNA

a. Elektroforesis Hasil PCR

Hasil penelitian pada pengamatan elektroforesis menunjukkan bahwa



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolat JR2 (L = *Ladder*, JR2 = Isolat fermentasi Kulit *JESIGO*)

b. Analisis Sekuen Gen 16S rRNA

Hasil sekuensing isolat JR2 dibandingkan dengan data GeneBank menggunakan program BLAST yang

kegiatan PCR yang telah dilakukan berhasil mengamplifikasikan daerah gen 16S rRNA isolat BAL fermentasi Kulit *JESIGO* yang terdapat pada Kabupaten Limapuluh Kota. Hal ini dapat dilihat dengan munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1400 bp yang merupakan ukuran yang diharapkan jika menggunakan primer forward F 16S-27F (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) dan primer reverse Primer R 16S-1492R (5'GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3). Hasil elektroforesis isolat BAL yang didapatkan adalah seperti gambar 1 dibawah ini.

dilakukan online pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Data hasil sekuensing dapat dilihat pada Gambar 2 dibawah ini.

Forward sequence 1424bp

```

1      AACTTGCCGT TAATTGATCA TGACGTGCTT GCACTGAATG AGATTTTAAAC ACGAAGTGAG
61     TGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC CTGCCCAGAA GCAGGGGATA ACACCTGGAA
121    ACTGATGCTA ATACCGTATA ACAGAGAAAA CCGCCTGGTT TTCTTTTAAA AGATGGCTCT
181    GCTATCACTT CTGGATGGAC CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA
241    AGGCGATGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TAATCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC
301    CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCACA ATGGACGCAA GTCTGATGGA
361    GCAACGCCGC GTGAGTGAAG AAGGGTTTCG GCTCGTAAAG CTCTGTTGTT AAAGAAGAAC
421    GTGGGTGAGA GTAACTGTTC ACCCAGTGAC GGTATTTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA
481    CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTG GCAAGCGTTA TCCGGATTTA TTGGGCGTAA
541    AGCGAGCGCA GGCGGTCTTT TAAGTCTAAT GTGAAAGCCT TCGGCTCAAC CGAAGAAGTG
601    CATTGAAAAC TGGGAGACTT GAGTGCAGAA GAGGACAGTG GAACTCCATG TGTAGCGGTG
661    AAATGCGTAG ATATATGGAA GAACACCAGT GCGGAAGGCG GCTGTCTGGT CTGTAACTGA
721    CGCTGAGGCT CGAAAGCATG GGTAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCATGCCGT
781    AAACGATGAT TACTAAGTGT TGGAGGGTTT CCGCCCTTCA GTGCTGCAGC TAACGCATTA
841    AGTAATCCGC CTGGGGAGTA CGACCGCAAG GTTGAAGTTC AAAAGAATTG ACGGGGGCCC
901    GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAGCTACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT
961    GACATCTTCT GCCAACCTAA GAGATTAGGC GTTCCCTTCG GGGACAGAAT GACAGGTGGT
1021   GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTGGGTTA AGTCCCAGCA CGAGCGCAAC
1081   CCTTATTACT AGTTGCCAGC ATTCAGTTGG GCACTCTAGT GAGACTGCCG GTGACAAACC
1141   GGAGGAAGGT GGGGACGACG TCAAATCATC ATGCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG
1201   CTACAATGGA TGGTACAACG AGTCGCGAAA CCGCGAGGTT TAGCTAATCT CTTAAAACCA
1261   TTCTCAGTTC GGAAGTGTAGG CTGCAACTCG CCTACACGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG
1321   CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA
1381   TGAGAGTTTG TAACACCCAA AGCCGGTGGG GTAACCTTTT AGGA

```

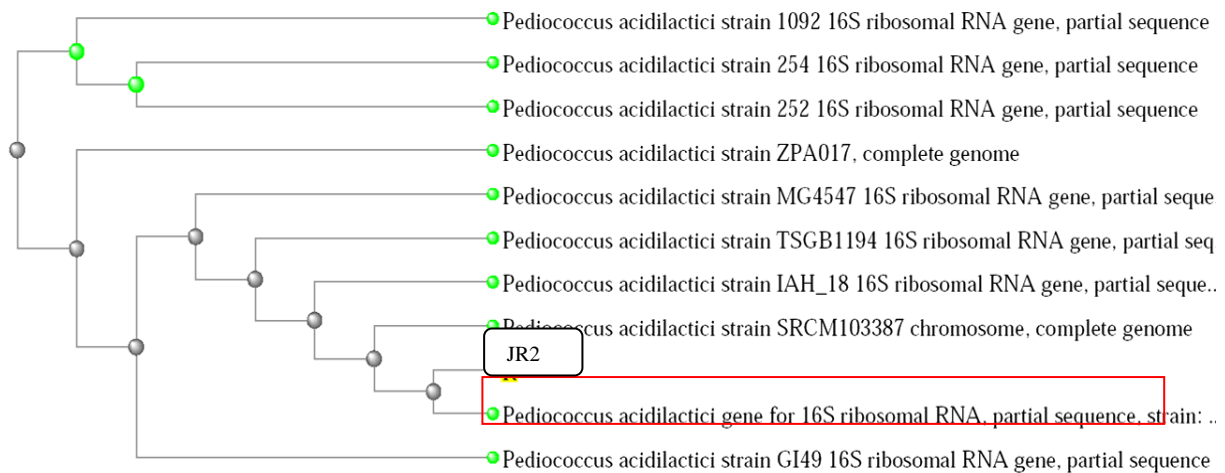
Gambar 2. Hasil sekuensing nukleotida isolat BAL JR2

Data hasil analisis BLAST dapat dilihat pada Tabel 9 dibawah ini.

Tabel 9. Hasil Analisis BLAST

No	Mikroorganisme	% Similarity	Accession Number
1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GI49	99.86%	MT158626.1
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MG4547	99.86%	MN368261.1
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain TSGB1194	99.86%	MN250807.1
4	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IAH_18	99.86%	MK990061.1
5	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain SRCM103387	99.86%	CP035154.1
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> BP110	99.86%	LC274607.1
7	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain ZPA017	99.86%	CP015206.1
8	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 1092	99.79%	MT573598.1
9	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 254	99.79%	MT573013.1
10	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 252	99.79%	MT573011.1

Hasil Pohon Filogenik BAL JR2 dapat dilihat pada Gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Pohon Filogenik BAL JR2

Berdasarkan hasil analisis menggunakan BLAST diperoleh jenis bakteri isolat fermentasi Kulit *JESIGO* kode sampel JR2 memiliki kemiripan 99.86% dengan *Pediococcus acidilactici*. Osmanagaoglu *et al.*, (2010) melaporkan bahwa *Pediococcus* yang merupakan salah satu BAL berbentuk kokus tidak resisten terhadap pH 2. *Pediococcus* sp adalah genus bakteri yang termasuk BAL dengan ciri non-motil (tidak bergerak) dan memiliki bentuk sferis. Sel bakteri ini terbagi ke dalam dua bidang, sehingga membentuk pasangan, tetrad (tersusun empat), atau gumpalan sel sferis yang lebih besar. Genus *Pediococcus* sp termasuk golongan fakultatif anaerob dan untuk hidup memerlukan lingkungan yang kaya nutrisi serta mengandung faktor pertumbuhan dan gula yang dapat difermentasi. Bakteri ini termasuk homofermentatif (hanya menghasilkan asam laktat) dan tidak dapat menggunakan pentosa (karbohidrat berat atom C5).

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bakteri asam laktat yang diperoleh dari hasil isolasi limbah kulit buah *JESIGO* berjumlah 1 isolat, dengan kode Isolat JR2. Morfologi koloni berupa kokus dengan koloni berbentuk tetra, berwarna putih susu, merupakan bakteri gram positif. Karakteristik isolat JR2 adalah katalase negatif, fermentasi positif dan tidak menghasilkan H₂S. Dan merupakan bakteri homofermentatif yang tidak menghasilkan produk samping selain asam laktat. Dari hasil identifikasi molekuler diketahui bahwa isolat JR2 yang berhasil dimurnikan adalah spesies *Pediococcus acidilactici*.

DUKUNGAN FINANSIAL

Tidak Ada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Laboratorium Teknologi Hasil Hewan/Mikrobiologi Universitas Andalas. Penulis mengucapkan

terima kasih kepada Professor Cluster Grant 2020, ketua tim: Prof. drh. Hj. Endang Purwati, MS, Ph.D.

DAFTAR PUSTAKA

1. E. Purwati, S. Syukur and Z. Hidayat. *Lactobacillus sp.* "Isolation from Biovicophitomega as probiotic". Indonesian Institute of Sciences, Jakarta, Bandung. 2005.
2. Ismail, Y. S., Yulvizar, C., dan Putriani. 2017. Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao L.*). *BIOLEUSER*, 1(2):45-53.
3. Osmanagaoglu, O., Kiran, F. dan Ataoglu, H. 2010. Evaluation of In Vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Volume 2: 162 – 174.
4. Phikunthong K, Yunchalard S. 2010. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. *Intl J Food Microbiol* 138: 200-204. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.024.
5. S. Syukur, L.S. Utami, E. Purwati, Urnemi dan Jamsari. "Screening and invitro antimicrobial, protease activities from West Sumatera, Indonesia". *International Seminar Proceedings HKI, Pekanbaru*, 17-21. July 2011.
6. Seeley Jr, H.W., Vandemark, P.J. & Lee, J.J. 2001. *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology*. Fourth Edition. W.H. Freeman and Company. New York. pp.185-209.
7. Y. B. Wang, J. R. Li & J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture : challenges and outlook. *Aquaculture*, 281 :1-4.
8. Y. Delfahedah, S. Syukur, and Jamsari. "Isolation of Characterization and DNA Identification of Lactic Acid Bacteria (LAB) which has the Potential as Antimicrobials from Fermentation of Hybrid Varieties of Cocoa (Trinitario)". *Jurnal Kimia Unand*. 2(4). 2013.
9. Yang E, Lihua F, Yueming J, Craig D, Sherry F. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* (2):48. DOI: 10.1186/2191-0855- 2-48
10. Yunenshi, F., S. Syukur dan E. Purwati. 2011. Pengaruh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* asal fermentasi kakao hibrid terhadap penurunan kolesterol telur itik pitalah. Masters Thesis. Program Pasca Sarjaa Universitas Andalas. Padang.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak Ada.