

**KARAKTERISASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)  
PROBIOTIK DENGAN GEN 16S rRNA YANG BERPOTENSI  
MENGHASILKAN BAKTERIOSIN DARI FERMENTASI  
SIRSAK (*Annona maricata* .L) DI SUMATERA BARAT**

**OLEH  
DELLA AMELIA UTAMI  
No. Bp. 0921207005**

**TESIS**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2011**

**KARAKTERISASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)  
PROBIOTIK DENGAN GEN 16S rRNA YANG BERPOTENSI  
MENGHASILKAN BAKTERIOSIN DARI FERMENTASI  
SIRSAK (*Annona maricata .L*) DI SUMATERA BARAT**

Oleh: DELLA AMELIA UTAMI

Dibimbing oleh Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M. Sc dan Prof. Dr. Abdi Darma,  
M. Sc

RINGKASAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada berbagai habitat yang cukup luas di alam seperti pada tanaman, saluran pencernaan hewan dan manusia, pada produk makanan kalengan, produk susu, produk fermentasi, buah-buahan dan sayur-sayuran tropis (Misgiyarti dan Widowati, 2005). BAL memproduksi asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan bakteriosin. Bakteriosin adalah suatu senyawa protein yang memiliki sifat bakterisidal terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteriosin dapat digunakan sebagai antibiotik alami dan biopreservasi makanan. BAL penghasil bakteriosin bermanfaat sebagai suplemen makanan karena berfungsi sebagai agen probiotik. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi BAL probiotik yang berpotensi menghasilkan bakteriosin, mengisolasi bakteriosin untuk penentuan ukuran berat molekul dan karakterisasi BAL secara molekuler dengan amplifikasi 16S rRNA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari fermentasi sirsak diperoleh 6 isolat BAL yang memiliki karakter koloni berbentuk bundar, elevasi cembung, berwarna putih susu dengan ukuran  $\pm 2-4$  mm pada medium selektif BAL yaitu MRS Agar. Pengamatan gram dari ke-6 isolat menunjukkan bahwa ke-6 isolat adalah gram positif yang berbentuk *coccus*. Ke-6 isolat pada uji antimikroba terhadap bakteri patogen, isolat S48C mempunyai kemampuan menghambat yang tinggi terhadap bakteri patogen terutama pada *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp* dengan zona bening berkisar antara 10-24 mm. PH optimum untuk pembentukan bakteriosin isolat S48C berkisar antara 4-5. Ukuran berat molekul bakteriosin partial adalah  $\pm 30$  kD dengan SDS-PAGE. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR menggunakan primer 27F dan 1525R diperoleh jumlah basa  $\pm 1500$ bp. Hasil sekuen 16S rRNA dengan menggunakan primer 1525F diperoleh panjang sekuen 631 nukleotida. Kemudian setelah analisis BLAST isolat S48C mempunyai persentase kemiripan 93% dengan *Pediococcus pentosaceus* yang merupakan spesies dari bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* yang potensial sebagai agen probiotik.

Kata kunci: Bakteri Asam Laktat, Uji antimikroba, isolasi bakteriosin, amplifikasi gen 16S rRNA, PCR.

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Bakteriosin adalah komponen ekstraseluler berupa peptida atau senyawa berupa protein antimikroba yang memperlihatkan suatu respon berlawanan terhadap bakteri tertentu (Jagadesswari, 2010). Sebagai senyawa antimikroba, bakteriosin mampu menghambat bakteri gram positif dan bakteri gram negatif seperti *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Listeria sp.*, *Shigella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio sp.*, yang menyebabkan berbagai macam penyakit pada manusia. Dewasa ini, berbagai macam antibiotik sintesis yang beredar di pasaran seperti penisilin, ampisilin, amoxilin dimanfaatkan sebagai antimikroba untuk membunuh bakteri penyebab penyakit pada manusia. Namun kadang kala pemberian dosis antibiotik yang tidak sesuai menyebabkan bakteri penyebab penyakit tidak mati dan menjadi resistens, sehingga pada jangka waktu tertentu akan terjangkiti penyakit yang sama. Selain itu penggunaan antibiotik sintesis memberikan efek samping terhadap kesehatan seperti gangguan ginjal dan sesak nafas karena antibiotik sintesis sulit didegradasi di dalam tubuh. Salah satu alternatif untuk melindungi manusia dari efek resisten mikroba penyebab penyakit tanpa ada gangguan kesehatan lainnya adalah dengan memanfaatkan bakteriosin sebagai antibiotik alami.

Bakteriosin selain sebagai antibiotik alami juga dapat di manfaatkan sebagai biopreservasi makanan karena memiliki beberapa keuntungan, yaitu tidak toksik dan mudah mengalami biodegradasi karena bakteriosin adalah

senyawa protein yang tidak membahayakan mikroflora usus, mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan, aman bagi lingkungan (Suardana, 2007). Bakteriosin dihasilkan oleh beberapa galur Bakteri Asam Laktat (BAL).

BAL telah digunakan sebagai pengawet makanan, kultur fermentasi dan pangan probiotik karena mempunyai aktivitas yang berlawanan dengan mikroorganisme patogen dan pembusuk makanan. BAL mampu memproduksi asam organik, metabolit primer dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), diasetil,  $CO_2$ , asetaldehid, D-isomer asam-asam amino, dan bakteriosin (Usmiati, 2002) yang berperan penting dalam menjaga dan memperpanjang masa simpan produk (Jagadeswari, 2010). Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* mempunyai aktivitas hambat yang besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen.

BAL selain penghasil bakteriosin juga memberikan efek fisiologis bagi kesehatan yaitu sebagai suplemen (pada makanan dan minuman), obat-obatan (seperti antibiotik alami), efek terapi (seperti hipokolesterol, antihipertensi, pencegah diare). BAL ini disebut sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang mana ketika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup memberi manfaat kesehatan terhadap inangnya (FAO/WHO,2001 dalam Velez et al,2007).

Mencari sumber-sumber mikroorganisme produktif mensintesis bakteriosin (BAL) adalah langkah yang paling memungkinkan untuk dilakukan. Di Indonesia memiliki banyak sumber-sumber habitat organisme BAL yang tumbuh secara alami, karena perbedaan kondisi lingkungan menjadikan keanekaragaman mikroorganisme. Selanjutnya keanekaragaman jenis BAL tersebut perlu dieksplorasi sifat-sifat dan potensinya sebagai bakteri probiotik yang potensial mensintesa bakteriosin.

Penelitian tentang isolasi BAL dan bakteriosin telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu (yoghurt, keju, dadih), fermentasi (tape, tempe, beer). Namun belum begitu banyak yang diisolasi dari buah-buahan dan sayur-sayuran tropis. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan sayuran seperti durian, nenas, sirsak, cacao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, kacang panjang dan lain sebagainya adalah potensial sebagai sumber BAL (Misgiyarta & Widowati, 2005).

Dari penelitian sebelumnya juga telah diisolasi dan diidentifikasi BAL berpotensi sebagai probiotik dari biskuit blondo, dengan uji antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen, isolasi bakteriosin dan amplikasi gen 16S rRNA (Dewita, 2010). Isolasi BAL pada fermentasi durian oleh Nur, (2005), isolasi dan karakterisasi bakteriosin berupa anti *Listeria* pada daging sapi dan unggas mentah (Dortu, 2008; Belgacem, 2007). Karakterisasi bakteriosin sebagai biopreservasi dari fermentasi berbagai makanan tradisional (Muyanja, 2003; Aslim, 2005; Todorov, 2006; Belgacem, 2007), susu unta di Morocco (Khedid, 2006), buah zaitu hijau di Iran (Mojgani,

2009) dengan menentukan uji aktivitas bakteriosin dan optimasi kondisi pertumbuhan BAL. Penentuan gen pengkode bakteriosin dari DNA plasmid *Carnobacterium piscicola* oleh Herbin (1997). Eksplorasi isolat BAL probiotik dari bekatul juga dilakukan oleh Zubaida (2007) memperlihatkan 4 dari 9 isolat yang potensial sebagai probiotik dari genera *Lactobacillus* setelah dilakukan identifikasi 16S rRNA.

Pemanfaatan BAL selain dalam industri makanan sebagai agen sintesa bakteriosin dalam biopreservatif juga memberikan kontribusi yang besar di bidang kesehatan sebagai agen antibiotik alami dan pangan probiotik. Berdasarkan alasan di atas maka penulis tertarik untuk mengkarakterisasi BAL probiotik yang berpotensi menghasilkan bakteriosin dari buah sirsak dengan judul **“Karakterisasi Molekular Bakteri Asam Laktat (BAL) Probiotik dengan Gen 16S rRNA yang Berpotensi Menghasilkan Bakteriosin dari Fermentasi Sirsak (*Annona muricata .L*) di Sumatera Barat”**.

## 1.2. Perumusan Masalah

Masih belum adanya penelitian tentang karakterisasi molekuler BAL probiotik yang potensial memproduksi bakteriosin yang diisolasi dari buah sirsak (*Annona muricata L.*) dan belum digalinya potensi buah-buahan yang terdapat di daerah tropis khususnya sirsak untuk dijadikan sumber BAL padahal buah-buahan dengan kadar asam dan jumlah karbohidrat yang tinggi merupakan sumber terbaik mikroorganisme asam laktat yang dapat menghasilkan bakteriosin.

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi BAL probiotik yang mampu menghasilkan bakteriosin.
2. Mengisolasi bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dengan dilanjutkan pada tahap penentuan ukuran berat molekul.
3. Mengkarakterisasi molekuler bakteri asam laktat probiotik dengan amplifikasi 16S rRNA.

### **1.4. Hipotesa Penelitian**

Hipotesis penelitian ini adalah bahwa diduga terdapat BAL probiotik yang produktif mensintesis bakteriosin dari fermentasi buah sirsak (*Annona muricata L.*) di Sumatera Barat.

### **1.5. Manfaat Penelitian**

1. Sebagai sumber informasi spesies BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada fermentasi buah sirsak sehingga menambah koleksi pada database penelitian BAL dan dapat dimanfaatkan sebagai pangan probiotik.
2. Menghasilkan produk bakteriosin yang dapat menghambat bakteri patogen sehingga dapat digunakan sebagai antibiotik alami dan biopreservasi makanan.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Isolasi BAL dari Fermentasi Sirsak

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dari buah sirsak yang di fermentasi merupakan suatu usaha untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat yang tumbuh secara spontan dari bahan yang mengandung sumber nutrisi mikroorganismenya. Buah Sirsak diambil sebagai sampel dari tanaman sirsak yang tumbuh di daerah  $\pm 200$  m dari pinggir pantai Kabupaten Pesisir Selatan. Sirsak yang akan di fermentasi adalah sirsak yang telah matang dengan ciri-ciri duri sirsak tidak tajam lagi, dipegang terasa empuk dan kulit sirsak berubah menjadi hijau buram. Sebelum difermentasi buah sirsak diperam  $\pm 4$  hari. Sebelum sampel di fermentasi dilakukan pengukuran pH dengan indikator universal, pH buah sirsak sebelum di fermentasi adalah 5,5. Kemudian sirsak di fermentasi selama 36 jam dan 48 jam. Pada tabel 4 diperlihatkan beberapa aspek yang di amati sebelum dan sesudah fermentasi.

Tabel 4. Sirsak sebelum dan sesudah fermentasi

Aspek yang di Amati	Sebelum Fermentasi	Fermentasi 36 jam	Fermentasi 48 jam
Warna	Putih	Putih tape	Putih tape
Bau (Gas)	Bau buah sirsak	Asam (tape)	Asam (tape)
Serat Sirsak	Lebih berserat	Lunak	Lunak
pH	5,5	4,2	4,5

Selama proses fermentasi dengan kondisi anaerob bakteri asam laktat tumbuh secara spontan karena pada sirsak tersedia sumber nutrisi bagi BAL terutama karbohidrat berupa glukosa, fruktosa atau sukrosa



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat S48C adalah bakteri dengan aktivitas hambat yang terluas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.*, dengan diameter zona hambat antara 10-24 mm (sangat kuat).
2. Isolat S48C yang mempunyai kemampuan menghasilkan suatu senyawa antimikroba yaitu bakteriosin pada pH 4-5.
3. Ukuran molekul bakteriosin isolat S48C adalah > 30 kDa.
4. Isolat S48C adalah bakteri asam laktat jenis baru yang hanya mempunyai kemiripan 93% dengan *Pediococcus pentosaceus*.

### 5.2. Saran

#### 5.2.1. Saran Akademik

Untuk penelitian selanjutnya, agar memperoleh sekuen DNA Genomik total isolat S48C untuk mengidentifikasi lebih lanjut, dilakukan uji aktivitas terhadap beberapa enzim, dan juga pemurnian bakteriosin serta karakterisasi lebih lanjut untuk dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik alami.

#### 5.2.2. Saran Aplikasi

Bakteri yang telah ditemukan ini hendaknya dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik dan penghasil bakteriosin untuk antibiotik alami bagi masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aslim, B., Yuksekdog, Z. N., Sarikaya, E., Beyati, Y. 2005. *Determination of the Bacteriocin-Like Substances Produced by Some Lactic Acid Bacteria Isolated From Turkish Dairy Products*. LWT Journal. Vol 38: 691-694.
- Asriani. 2006. *Kajian Efek Sinergi Antimikroba Metabolit Bakteri Asam Laktat dan Monoasilgliserol Minyak Kelapa Terhadap Mikroba Patogen Pangan*. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Aymerich, T. et. al. 1996. *Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Anti *Listeria* Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocin*. App. And Environ. Microbiol. 62(5): 1676-1682.
- Belgacem, Z. B, et. al. 2007. *Screening for Anti-Listeria Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from "Gueddid" a Traditionally Tunisian Fermented Meat*. Journal of Meat Science, Vol 8: 513-521.
- Cai, Hugh., Archambault, Marie, Prescott, J. 2003, *16S rRNA Sequence Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria*. Journal Vet Diagnostic Investigation. 15: 465-469.
- Cintas, M. Luis, et. al. 1995. *Isolation and Characterization of Pediocin L50, a New Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a Broad Inhibitory Activity*. Applied and Environmental Microbiology, Vol 61: 2643-2648.