

Bidang Unggulan : Bioteknologi
Kode>Nama Rumpun Ilmu : 219/Bioteknologi Peternakan

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN
SKIM KLASTER RISET MULTIDISIPLIN (KRM)
BIOTEKNOLOGI**

DANA PNBP PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS



**KARAKTERISASI MOLEKULER DAN BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM
LAKTAT ASAL TEMPOYAK**

TIM PENGUSUL :

Prof. drh. Hj. Endang Purwati R N, MS., Ph.D/ 0017035106 (Ketua)

drh. H. Yuherman. MS., Ph.D/ 0024115902 (Anggota)

Puji Hartini R./ 1621652001 (Mahasiswa S2)

UNIVERSITAS ANDALAS

2017

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR PENELITIAN
SKIM KLASTER RISET MULTIDISIPLIN (KRM) PASCASARJANA**

Judul Penelitian : Karakterisasi Molekuler dan Bakteriosin
Bakteri Asam Laktat Asal Tempoyak

Bidang : Kemandirian Pangan/Bioteknologi

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Prof. drh. Hj. Endang Purwati R N, MS., Ph.D

b. NIDN : 0017035106

c. Jabatan Fungsional : Pembina Utama

d. Program Studi : Bioteknologi

e. Nomor HP : 081267529701

f. Alamat Surel (e-mail) : purwati17@yahoo.co.id

Anggota Peneliti (1) :

a. Nama Lengkap : drh. H. Yuherman, MS., Ph.D

b. NIDN : 0024115902

c. Perguruan Tinggi : Universitas Andalas

Mahasiswa yang terlibat :

a. Nama Lengkap : Puji Hartini R.

b. No. BP : 1621652001

c. Jenjang : S2 Bioteknologi

Lama Penelitian Keseluruhan : 1 Tahun

Usulan Penelitian Tahun Ke- : 1

Biaya Penelitian Keseluruhan : 50.000.000

Biaya Penelitian :

- Diusulkan ke DRPM : :

- Dana internal PT : 50.000.000

- Dana institusi lain : Rp...../ *in kind* tuliskan :

Biaya Luaran Tambahan :

Padang, 30 November 2017

Mengetahui,
Direktur Pascasarjana Universitas Andalas



Dr. Ir. Rudi Febriamansyah, M.Sc)
NIP. 208 198702 1 001

Ketua Peneliti,



(Prof. drh. Hj. Endang Purwati R N, MS., Ph.D)
NIP. 19510317 197803 2 001

Menyetujui,
Ketua LPPM Universitas Andalas



(Dr. Ing. Uyang Gatot S. Dinata)
NIP. 19660709 199203 1 003

Daftar Isi

	Halaman
Halaman Pengesahan	1
Daftar Isi	2
Ringkasan	3
Bab 1. Pendahuluan	4
Bab 2. Metode Penelitian	7
Bab 3. Hasil Penelitian	18
Daftar Pustaka	33
Lampiran	35

RINGKASAN

Tempoyak adalah masakan yang berasal dari buah durian yang difermentasi secara spontan dalam keadaan anaerob. Masa simpan tempoyak sangat bervariasi antara 2 bulan sampai 1 tahun. Lamanya masa simpan ini akibat ditekannya pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk oleh asam yang diproduksi oleh bakteri asam laktat selama proses fermentasi pada tempoyak. Dari hasil fermentasi anaerob pada tempoyak adalah peran dari Bakteri Asam Laktat (BAL). dalam bidang bioteknologi saat ini BAL yang dihasilkan oleh suatu pangan fermentasi bisa dimanfaatkan untuk pengolahan pangan dan lain sebagainya. Pada dasarnya untuk mendapatkan BAL yang potensial perlu dilakukan isolasi dan skrining BAL, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi DNA molekular, purifikasi secara molekular menggunakan 16S rRNA dan uji bakteriosin, hingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik untuk menjaga kesehatan total. BAL potensial, yang telah terkarakterisasi dan teridentifikasi baik konvensional maupun molekular yang dipatenkan memiliki nilai yang tinggi untuk diaplikasikan yaitu di bidang kesehatan, keamanan pangan (*food safety*) dan di bidang peternakan sebagai probiotik/*supplement*. Penggunaan BAL sebagai probiotik dan bakteriosin sebagai antibiotik alami adalah suatu upaya untuk mengurangi penggunaan antibiotik sintesis dan efek negatif dari konsumsi antibiotik terus menerus mengakibatkan resistensi mikroba terhadap antibiotik, dan mikroba resistan antibiotik sangat berbahaya untuk lingkungan. Bakteriosin bersifat antimikroba potent yang struktur kimianya merupakan senyawa protein sederhana (peptida) yang bersifat sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen dan tidak berbahaya untuk manusia dan hewan. Penelitian tentang pemurnian bakteriosin dan penentuan berat molekul dan struktur kimianya, telah membuka potensi penggunaan antibiotik alami sebagai pengganti antibiotik sintesis. Hasil sekuensing BAL dari tempoyak yakni 1). *Lactobacillus fermentum* strain IMAU32708 dan 2). *Lactobacillus fermentum* strain CAU6337.

Kata kunci : *tempoyak, bakteri asam laktat, karakterisasi, 16S rRNA, bakteriosin*

BAB I. PENDAHULUAN

Bahan pangan merupakan kebutuhan utama manusia yang dikonsumsi sesuai dengan kebutuhan zat gizi yang diperlukan oleh tubuh. Salah satu sumber zat gizi diantaranya adalah produk pangan hasil ternak, dimana produk yang dihasilkan harus tetap memperhatikan mutu dan daya terima konsumen. Sejalan dengan semakin banyaknya penelitian yang dilakukan, semakin tinggi pula kesadaran masyarakat terhadap kesehatan dan menjaga kondisi tubuh agar tetap terjaga dengan baik. Hal ini terlihat dari banyaknya produk makanan yang memiliki nilai mutu yang tinggi dan tingkat keamanan pangan yang lebih baik.

Bakteri Asam Laktat (BAL) akhir-akhir ini menjadi pokok bahasan dibidang sains, kesehatan dan industri karena banyak manfaatnya untuk menjaga kesehatan. Marteau (2002) menjelaskan, BAL merupakan jenis mikroorganisme yang aman (*food grade microorganism*) yang dikategorikan sebagai mikroba yang baik atau aman untuk kesehatan (*Generally Recognized As Safe*) atau (GRAS). Menurut WHO (2002), BAL dalam usus akan memberikan keuntungan bagi inangnya, minimum dalam jumlah 10^8 CFU/g.

Purwati, Syukur, dan Yunenshi (2011) untuk mendapatkan BAL yang potensial perlu dilakukan isolasi dan skrining BAL, identifikasi morfologi, karakterisasi biokimia, identifikasi DNA molekular, purifikasi secara molekuler menggunakan 16S rRNA dan uji bakteriosin, hingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik untuk menjaga kesehatan total. BAL potensial, yang telah terkarakterisasi dan teridentifikasi baik konvensional maupun molekular yang dipatenkan memiliki nilai yang tinggi untuk diaplikasikan yaitu di bidang kesehatan, keamanan pangan *food safety* dan di bidang peternakan sebagai probiotik/*supplement*.

Ekowati (2006) salah satu makanan tradisional dari Sumatera adalah tempoyak. Tempoyak adalah masakan yang berasal dari buah durian yang difermentasi secara spontan dalam keadaan anaerob. Masa simpan tempoyak sangat bervariasi antara 2 bulan sampai 1 tahun. Lamanya masa simpan ini akibat ditekannya pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk oleh asam yang diproduksi oleh bakteri asam laktat selama proses fermentasi pada tempoyak. Hal

inilah yang menjadi menarik untuk diteliti, untuk mendapatkan BAL potensial sebagai probiotik jika dilakukan isolasi, penentuan antimicrobial bakteriosin, karakterisasi molekular bakteri asam laktat dari fermentasi tempoyak.

Tempoyak dari durian Sumbar juga bahan baku halal untuk BAL. Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. 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. Kusmiati dan Malik (2002) menyatakan beberapa jenis bakteriosin dari BAL mempunyai spektrum yang luas dan mempunyai aktivitas menghambat terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen pada makanan seperti *Listeria monocytogenes* dan *Staphylococcus aureus*. Afrianto, Liviawaty dan Rostini (2006) berpendapat bahwa BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan berpengaruh terhadap kualitas dan daya simpan dadih tersebut. Ini semua saling berkaitan antara jenis bambu yang digunakan, total koloni dan jenis dari bakteri asam laktat yang terdapat baik di bambu maupun pada dadih. BAL menghasilkan bakteriosin yang sangat efektif dipakai untuk mengontrol bakteri patogen dan perusak pada produk makanan yang dingin dan makanan dalam kantung vakum yang diharapkan agar mempunyai daya simpan yang lama.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat semakin mendapat perhatian sebagai bahan tambahan makanan (*food additives*) yang berpotensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen sebagai pengkontaminasi makanan. Bakteriosin dapat dihasilkan dari bakteri gram positif, seperti *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Pediococcus halophilus* dan *Pediococcus cerevisiae* yang diisolasi dari yoghurt, keju dan susu fermentasi (Mohammed dan Ijah, 2013).

Bakteriosin merupakan peptida, senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, yang memiliki potensi sebagai pengawet

alami (biopreservasi) untuk menggantikan pengawet kimia bahan makanan. Konsumen mulai memperhatikan formulasi produk pangan yang menggunakan pengawet kimia, sehingga adanya permintaan dari konsumen dalam mengkonsumsi makanan sehat, salah satunya adalah penggunaan bahan alami dalam formulasi makanan.

Bakteriosin dapat diekstraksi dari bakteri melalui proses propagasi dalam media dalam kondisi lingkungan yang dapat menginduksinya untuk menghasilkan senyawa peptide tersebut. Bakteriosin yang dihasilkan bermacam-macam jenisnya tergantung pada strain penghasilnya. Ekstraksi bakteriosin penting untuk memperbaiki pengawetan makanan pada makanan olahan yang tidak melibatkan proses fermentasi dan bagi makanan yang tidak cocok untuk diinokulasikan dengan bakteri asam laktat. Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* mendapat perhatian yang lebih banyak mengingat peranan positif bakteri ini dalam usus manusia (Surono, 2004).

Penelitian ini bermanfaat untuk meningkatkan aplikasi inovasi pengolahan sabun probiotik yang berasal dari makanan tradisional Sumatra khas melayu yaitu tempoyak. Sebagai yoghurt susu kambing ekstrak buah naga yang menyehatkan, dan bernilai jual lebih sebagai pangan fungsional. Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah tentang identifikasi molekuler bakteri potensial probiotik BAL asal tempoyak yang berasal dari Sumatera Barat.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1. Fermentasi Tempoyak menurut Hanum, 2002 :

- 1) Buah durian yang telah matang dikupas dan diambil isinya sebanyak 200 gr.
- 2) Isi buah durian dipisahkan antara daging dan bijinya, dibagi menjadi empat bagian, masing-masing 50 gr,
- 3) Daging durian yang sudah dipisahkan empat bagian masing-masing 50 gr diberi perlakuan fermentasi ada yang ditambahkan garam 3% garam, 3% cabe, ditutup daun pisang, dan tanpa penambahan
- 4) Setelah diberi perlakuan fermentasi, masing-masing 4 bagian daging durian dimasukkan ke dalam stoples yang tertutup rapat sehingga tercipta suasana anaerob.
- 5) Toples dibiarkan pada suhu kamar selama satu minggu. Setelah satu minggu, stoples dibuka dan tempoyak siap diisolasi.

2.2. Analisa Proximat Tempoyak

a. Kadar Air

Kadar air dihitung sesuai dengan pedoman Sudarmadji, Haryono dan Suhardi (1996) dengan prosedur kerja sebagai berikut :

- a) Dibersihkan cawan porselin lalu dikeringkan didalam oven listrik pada suhu 105 °C-110 °C selama 1 jam.
- b) Kemudian dimasukkan kedalam eksikator selama 1 jam.
- c) Setelah dingin ditimbang cawan porselen dengan neraca analitik (X gram).
- d) Kemudian timbang 1 gram sampel dan dimasukkan kedalam cawan porselen yang telah ditimbang (Y gram).
- e) Lalu dikeringkan dalam oven listrik dengan suhu 105°C-110 °C selama 8 jam.
- f) Kemudian didinginkan dalam eksikator selama 1 jam.
- g) Setelah dingin ditimbang dengan neraca analitik. Penimbangan terus dilakukan sampai beratnya tetap (Z gram).

$$\text{Perhitungan : Kadar Air} = \frac{x + y - z}{y} \times 100\%$$

Keterangan :

X : Berat cawan kosong

Y : Berat sampel awal

Z : Berat cawan dan sampel (setelah pengeringan)

b. Kadar Protein

Menurut Sudarmadji, Haryono, dan Suhardi (1996) dengan Metoda Mikro Kjeldahl, cara kerjanya sebagai berikut :

- 1) Destruksi :
 - a) 1 gram sampel kering dan 1 gram katalisator selenium lalu ditambahkan 25 ml H₂SO₄ pekat dimasukkan kedalam labu Kjeldahl.
 - b) Lalu didestruksi di dalam lemari asam mulai api kecil dan dikocok sewaktu-waktu sampai berwarna kuning jernih.
- 2) Destilasi
 - a) Larutan dalam labu Kjeldahl diencerkan ke dalam labu ukur 250 ml dengan aquades dan dibilas dengan aquades sampai tanda garis.
 - b) Alat penyulingan dipasang dan pada labu destilasi diberi batu didih, lalu dimasukkan 25 ml larutan contoh + aquades 75 ml, lebih kurang 25 ml NaOH 30% melalui tichter.
 - c) Kemudian labu penampung dipasang berisi 25 ml 0.05 N H₂SO₄ + 3 tetes indikator MM.
 - d) Selanjutnya dilakukan penyulingan sampai 2/3 dari cairan telah tersuling, lalu dilakukan pembilasan pada alat penyulingan kedalam labu penampung.
- 3) Titrasi
 - a) Titrasi larutan hasil penyulingan tadi dengan NaOH 0.1 N memakai mikroburet sampai terjadinya perubahan warna (X ml).
 - b) Kemudian dibuat peniteran blangko, ditambahkan 3 tetes indikator MM ke dalam H₂SO₄ 25 ml 0.05 N dan dititrasi dengan NaOH 0.1 N (Y ml).

dengan perhitungan :

$$\text{kadar protein} = \frac{(Y - X) \times N \times 0.014 \times C \times 6.38}{Z} \times 100\%$$

dimana :

- Y = Jumlah ml NaOH peniteran blangko
- X = Jumlah peniteran ml NaOH contoh
- N = Normalitas NaOH
- Z = Berat sampel (gram)
- C = Pengenceran
- 0.014 = Konstanta
- 6.38 = Faktor konversi dari total nitrogen kedalam protein

c. Kadar Lemak

Berdasarkan pedoman Sudarmadji dkk. (1996) pada kadar lemak yang hilang dengan Metoda Ekstraksi Soxhlet, cara kerjanya sebagai berikut :

- 1) Sampel 1 gram dibungkus dengan kertas lemak lalu dikeringkan dalam oven selama 12 jam pada suhu 105-110⁰C (c gram).
- 2) Setelah itu ditimbang dalam keadaan panas bungkusannya tersebut satu persatu (b gram).
- 3) Lalu diekstraksi dengan benzena selama 16 jam sampai benzena dalam soxhlet jernih, kemudian sampel tersebut diangin-anginkan hingga kering (benzena akan menguap).
- 4) Kemudian dikeringkan dalam oven listrik dengan suhu 105-110⁰C selama 4 jam dan ditimbang bungkusannya tersebut satu persatu (a gram).

Dengan perhitungan :

$$\text{Kadar lemak} = \frac{b - a}{c} \times 100\%$$

Dimana :

- a = Berat sampel sesudah ekstraksi (gram)
- b = Berat sampel sebelum ekstraksi (gram)
- c = Berat sampel (gram)

d. Nilai pH

Dengan menggunakan alat pH meter.

2.3. Total Koloni Bakteri Asam Laktat menurut Purwati *et al.*, 2005 :

- 1) Semua peralatan yang dibutuhkan seperti: cawan petri (*petridish*), tabung reaksi, erlenmeyer, tabung *ependorf*, tip pipet mikro, *hockeystick*, disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 lbs.
- 2) Dipersiapkan media *preenrichment* yaitu dengan melarutkan 52,2 g *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) *Broth* (Merck) dalam 1000 ml. Dihomogenisasi dengan *magneticstirrer* diatas *hot-plate* pada suhu 100°C, kemudian di *autoclave* (15 menit, 121°C dan tekanan 15 lbs), setelah agak dingin dituang ke dalam 7 tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml.
- 3) Dipersiapkan media MRS Agar (Merck) dengan melarutkan 68,2 g MRS Agar dalam 1000 ml aquades.
- 4) Dihomogenisasi dengan *magneticstirrer*, diatas *hotplate* pada suhu 100°C, lalu di *autoclave*, setelah agak dingin ($\pm 55^{\circ}\text{C}$) lalu dituang ke dalam 7 cawan petri masing-masing sebanyak ± 15 ml.
- 5) Tempoyak diambil menggunakan sendok steril dan aluminium foilsebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan 9 ml larutan MRS *Broth*, lalu divortex sampai homogen. Hasil ini disebut pengenceran 10^{-1} . Hasil pengenceran tersebut diambil 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan MRS *Broth*, lalu divortex sampai homogen. Hasil pengenceran ini disebut dengan pengenceran 10^{-2} , begitu seterusnya sampai pada pengenceran 10^{-7} .
- 6) Dari pengenceran 10^{-7} diambil 100 μl sampel dan ditanam dengan metode *spread* pada *petridish* yang telah berisi media MRS Agar kemudian diratakan dengan *hockeystick* yang sebelumnya telah diberi alkohol dan dibakar dengan bunsen. Pekerjaan ini dilakukan dalam *laminar air flow* dan dibelakangkunsen.
- 7) Inokulum disimpan dalam *anaerobjar* lalu dimasukkan dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengkodean *petridish*.
- 8) Setelah 48 jam, koloni BAL yang tumbuh dilihat dengan menggunakan alat *quebec colony counter* setelah koloni bakteri terhitung lalu dikalikan

10 (jumlah koloni BAL), selanjutnya total koloni BAL/*Colony Forming Unit* (CFU)/g dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{CFU/g} = \text{jumlah koloni BAL} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{1}{\text{faktor berat sampel}}$$

2.4. Isolasi Bakteri Asam Laktat menurut Purwati *et al.*, 2005 :

- 1) Sebanyak 1 mL sampel tempoyak diencerkan dalam 9 mL MRS Broth, vortex hingga homogen
- 2) Hasil pengenceran 10^{-1} tersebut dimasukkan kedalam *anaerobic jar*
- 3) Inkubasi selama 48 jam dalam inkubator pada suhu 37°C
- 4) Sebanyak 1 mL dari hasil pengenceran 10^{-1} dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan MRS Broth lalu vortex sampai homogen. Hasil pengenceran ini disebut dengan pengenceran 10^{-2}
- 5) Lakukan pengenceran tersebut sampai pada pengenceran 10^{-7}
- 6) Sebanyak 100 μL sampel hasil pengenceran 10^{-7} ditanam dengan metode *spread* pada cawan petri yang telah berisi media MRS Agar, kemudian ratakan dengan *hockey stick* yang sebelumnya telah disterilkan
- 7) Inokulum disimpan dalam *anaerobic jar*
- 8) Inkubasi dalam inkubator pada saat 37°C selama 48 jam
- 9) Amati *single colony* yang tumbuh pada media tersebut
- 10) Menggunakan jarum ose, *single colony* dipindahkan ke media MRS Agar untuk pemurnian koloni dengan metode *streak*
- 11) Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C selama 24 jam.

2.5. Pewarnaan Gram, Purwati *et al.*, 2005 :

- 1) Diambil biakan bakteri dan bakteri diratakan di atas kaca benda (preparat) yang telah dibersihkan dengan alkohol
- 2) Dikeringkan di atas bunsen atau alat pengering
- 3) ditetesi dengan zat warna kristal violet
- 4) Ditunggu selama 1 menit agar zat warna meresap oleh bakteri
- 5) Dibilas dengan air mengalir dan ditetesi dengan larutan iodin kompleks, kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir

- 6) Dicuci dengan alkohol dengan cara mencelupkan ke dalam alkohol encer,
- 7) Ditetesi dengan zat warna safranin, lalu ditunggu 30 detik
- 8) Dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop.

2.6. Uji Katalase Modifikasi Public Helath, menurut England, 2014 :

- 1) Isolat BAL diambil menggunakan jarum ose.
- 2) Kemudian digores pada *object glass*.
- 3) Hidrogen peroksida (H₂O₂) ditetaskan.
- 4) Dilakukan pengamatan dengan cara melihat terbentuk atau tidaknya gas pada ulasan bakteri.

2.7. Uji Tipe Fermentasi menurut Suryani dan Jufrie, 2010 :

- 1) Isolat BAL dimasukkan dalam 5 ml *MRS Broth* MERCK
- 2) dimasukkan tabung durham dengan posisi terbalik.
- 3) Diinkubasi 48 jam.
- 4) Dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya gelembung udara pada tabung durham.

2.8. Skrining BAL Potensial Antimikroba menurut, Yang, Fan, Jiang, Doucette dan Fillmore, 2012 :

- 1) Uji resistensi antimikroba BAL dilakukan terhadap tiga bakteri uji yaitu *Eschericia coli O157*, *Listeria monocytogenesis* dan *Staphylococcus aureus*. Kultur BAL 1 ml disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 27°C, supernatannya digunakan untuk resistensi antimikroba.
- 2) *Nutrient agar* sebanyak 20 ml dituang. Kemudian ditambahkan 0,2% bakteri uji yang sudah diremajakan, dihomogenkan, didiamkan hingga agar mengeras. *Well* dibuat sebanyak isolat yang akan digunakan dan pemberian label.
- 3) Kemudian diinjeksikan 50 µl supernatan BAL dengan pipet mikro. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C secara *aerob*.

- 4) Pengamatan dilakukan terhadap zona bening yang berbentuk lingkaran pada jam ke-24 dengan menggunakan jangka sorong.

2.9. Ekstraksi Genom Bakteri Gram Positif dengan KIT Promega (USA) :

- 1) Sampel isolat BAL yang single koloni dari MRS Broth dipipet sebanyak 1000 µl dan dimasukkan dalam eppendorf baru,
- 2) Sentrifuse 14.000 rpm selama 2 menit. Lalu dibuang supernatan, pelet diambil, Ditambahkan 480 µl 50mM EDTA,
- 3) Selanjutnya ditambahkan 120 µl Lysozyme,
- 4) Inkubasi dalam waterbath 37⁰C selama 60 menit,
- 5) Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm. Lalu dibuang supernatan, pelet diambil,
- 6) Ditambahkan 600 µl nuclei lysis solution lalu dihomogenkan dengan micropipette, Inkubasi 80⁰C selama 5 menit. Lalu diamkan pada suhu ruang,
- 7) Ditambahkan 3 µl RNase Solution, lalu dihomogenkan dan inkubasi dalam waterbath 37⁰C selama 60 menit,
- 8) Ditambahkan 200 µl Protein precipitation solution lalu vortex,
- 9) Inkubasi dalam es selama 5 menit,
- 10) Sentrifuse selama 3 menit 14.000 rpm. Lalu pipet supernatannya dipindahkan pada eppendorf baru, pellet dibuang,
- 11) Tambahkan 600 µl isopropanol lalu dihomogenkan,
- 12) Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm, lalu diambil pellet , supernatan dibuang, Ditambahkan 600 µl ethanol 70% lalu dihomogenkan,
- 13) Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm, lalu diambil pellet , supernatan dibuang,
- 14) Diangin-anginkan eppendorf yang berisi pellet tersebut selama 15 menit,
- 15) Rehidrasi DNA pellet dengan ditambahkan 10 – 100 µl Rehydration solution selama 60 menit pada 65⁰C.

2.10. Isolasi dan Penentuan Ukuran Molekul Bakteriosin

Isolasi dan penentuan ukuran molekul bakteriosin dilakukan berdasarkan metoda Purwati Rusfidara, Akmandian, Juliyarsi, Purwanto (2010) sebagai berikut :

Optimasi pembentukan bakteriosin :

1. Isolat yang memiliki zona bening tertinggi, diinkubasi semalam pada suhu 37°C, dalam keadaan anaerob.
2. Kultur disentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit, uji antimikroba dengan metoda difusi sumur agar, ditentukan pH dengan zona bening tertinggi

Isolasi bakteriosin :

1. Kultur bakteri ditanam kedalam MRS Broth 100 ml (pH optimum) selama semalam.
2. Supernatan diperoleh setelah kultur disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipresipitasi dengan ammonium sulfat 60% dibiarkan semalam dalam suhu 4°C. Disentrifugasi 10.000 rpm selama 30 menit. Diambil pelletnya kemudian ditambahkan 1.5 Tris HCl pH 8.5.
3. Sampel didialisis selama semalam dengan buffer dialisis dengan dua kali pergantian buffer. Sampel hasil dialysis dimasukkan ke dalam tube dan disimpan pada -20°C untuk kemudian dilakukan SDS PAGE.

SDS-PAGE :

1. Separating gel 12% (4000 µl ddH₂O, 3750 µl Tris HCl 1.5 M pH 8.8 containing 10% SDS, 6000µl 30%, SKROSA 1.35 gr, 50µl APS dan 10µl temed) diratakan dengan H₂O dan dibiarkan 30 menit.
2. Stacking gel 3.9% (1525 µl dH₂O, 625 µl Tris containing 0.4% SDS pH 6.8, 325 µl acrylamide 30%, 12.5 µl APS dan 2.5 µl Temed).
3. Gel tray dipasang comb, kemudian dimasukkan ke dalam cast gel SDS-PAGE.
4. Ditambahkan buffer *running*, dimasukkan sampel dan protein marker ke dalam well, di *running* selama 90 menit, 20 mA

2.11. PCR

Persiapan primer PCR (16S rRNA)

1. PrimerR (16S-1492R, T_m 47°C, 5'GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3) dan F (16S- 27F, T_m 54.3°C, 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3), disiapkan (konsentrai 10pM)
2. Ambil 90 µl dH₂O + 10µl (Primer R dan F)
(Catt : Primer R dan F dalam TE buffer (konsentrasi 100µM))

Persiapan sampel :

Primer 16S rRNA

	1 kali
Master Mix PCR	12.5
Primer F	1.0
Primer R	1.0
dH ₂ O	9.5
	24.0
DNA (tetap)	1.0
Total	25.0

PCR program

		40 cycle
Pre denaturasi	95°C	2 menit
Denaturasi	95 °C	45 detik
Anneling	56 °C	45 detik
Extention	72 °C	1 menit 40 detik
Final extention	72 °C	10 menit
Pendinginan	4 °C	~

Persiapan agarose

- Agarose untul elektroforesis PCR : 1.5 %

Persiapan Gel elektroforesis untuk PCR :

1. Agarose 1.5% x 40 ml = 0.6 g
2. Dilarutkan dalam TAE 40ml dan dipanaskan (microwafe 30 detik)

3. Setelah agak panas suam-suam , dimasukkan 2 ul *redsafe/Gelview* (staining)
4. Tinggi agar kira-kira 0.5 mm
5. Masukkan agarose dan susun *comb* elektroforersis
6. Tunggu agarose beku selama 20 menit dan *comb* diangkat.

Running Gel Elektroforesis :

1. Letakkan agar di dalam elektroforesis
2. Masukkan larutan TAE hingga agar terbenam
3. Injek sampel 5 μ l + 2 μ l *loading dye* ke dalam *well* agar
4. Masukkan DNA ladder 5 μ l
5. Atur 100V, 40 menit
6. Gel kemudian diletakkan didalam wadah ditambah lagi dengan TAE sampai terendam. Gel kemudian dilihat dibawah lampu UV.
7. Setelah terbaca di UV sampel dari hasil PCR yang terbaca kemudian dipurifikasi untuk dikirim sekuensing.

2.12. Purifikasi DNA dengan Promega Kit Protocol

Purifikasi DNA berdasarkan metoda Mustopa (2009) sebagai berikut :

1. Band DNA dipotong dari gel agarose, dimasukkan gel ke dalam tabung *ependorf* dan ditambah 300 μ l nucleuse free water, kemudian diletakkan di waterbath pada 60°C selama 10 menit.
2. Dimasukkan sampel pada kolom QIAquick dan disentrifugasi 10000 rpm selama 45 detik pada suhu ruang.
3. Ditambahkan 700 μ l *membrane wash solution* dan disentrifugasi 10000 rpm selam 1 menit pada suhu ruang.
4. Ditambahkan lagi 700 μ l *membrane wash solution* dan disentrifugasi lagi 10000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
5. Dipindahkan kolom QIAquick pada 1,5 ml tabung *ependorf* baru dan ditambah elusi (30 μ l *nuclease free water*) pada bagian tengah kolom QIAquick.

6. Ditunggu 1 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* baru dan disentrifugasi 10000 rpm selama 2 menit, lalu disimpan pada suhu – 20°C.

2.13. Analisis Data Sekuensing

Analisis data *sequence* dilakukan menggunakan program *software* DNA star. Untuk analisa *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan *sequencing* yang diperoleh (*query*) dengan yang telah ada pada *Gene Bank* dengan data base searches NCBI internet site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), selanjutnya untuk melihat kekerabatannya dilanjutkan dengan Clustal W (Mustopa, 2009).

BAB 3. HASIL PENELITIAN

3.1. Tahapan Penelitian

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat asal tempoyak, pengambilan buah berasal dari daerah Jorong Bandar Manggis, Nagari Kayu Tanam, Kecamatan 2x11 Kayu Tanam, Kabupaten Padang Pariaman.

3.2. Sampel Tempoyak

Durian merupakan buah eksotis yang berasal dari daerah tropis. Buah ini terutama terdapat di Asia Tenggara, sebagian besar diproduksi di Malaysia, Indonesia, Thailand, Filipina Berikut dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini:



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. (a)Pohon Durian (b) Buah Durian (c) Daging Durian

Pada Gambar.1 (a) terlihat pohon durian yang berbuah yang siap untuk dikonsumsi, sebagian besar masyarakat di Kayu Tanam, menikmati buah durian (Gambar. 1 (c)) dengan langsung dimakan segar, atau daging buahnya yang matang dicampur dengan kolak, dimakan bersama ketan, atau diolah menjadi tempoyak sebagai sambal masakan yang telah dicampur bersama cabe, diberikan

sedikit garam dimakan bersama nasi dengan cara memisahkan dari bijinya (Gambar 1.(c)).

Tempoyak merupakan salah satu produk makanan melalui proses fermentasi, dimana prinsip dari pembuatan tempoyak dengan fermentasi an-aerob daging durian dibiarkan selama 2 minggu disimpan dalam toples kedap udara didiamkan pada suhu ruang. Pembuatan tempoyak pada penelitian ini dilakukan fermentasi tempoyak yang dilakukan menggunakan perlakuan fermentasi penambahan daun pisang, cabe 3%, garam 3%, dan tanpa penambahan (original), berikut dapat dilihat pada Gambar 2.



(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 2. (a) Tempoyak garam 3%, (b)Tempoyak cabe 3%, (c) Tempoyak original (d) Tempoyak daun pisang.

Proses pembuatan tempoyak sangat sederhana, Buah durian yang telah matang dikupas dan diambil isinya. Isi buah durian dipisahkan antara daging dan bijinya, kemudian daging durian tanpa biji diberikan fermentasi dengan empat perlakuan ditambah daun pisang, garam 3%, cabe 3%, dan tanpa penambahan, kemudian dimasukkan ke dalam toples yang tertutup rapat sehingga tercipta suasana anaerob. Toples dibiarkan pada suhu kamar selama dua minggu.

3.3. Analisis Proximat Durian dan Tempoyak

Analisis proximat yang dilakukan terdiri dari pengukuran kadar protein, kadar air, dan kadar lemak terhadap durian segar, tempoyak yang dilakukan terhadap sampel menggunakan perlakuan fermentasi penambahan daun pisang (TD), tempoyak fermentasi penambahan cabe 3% (TC), tempoyak fermentasi penambahan garam 3% (TG), dan tempoyak fermentasi tanpa penambahan (original) (TO).

Tabel 1. Analisa Proximat Durian dan Tempoyak

Sampel	Kadar Air (%)	Kadar lemak (%)	Kadar Protein (%)
Durian segar	73.55	7.33	5.66
T O	70.21	6.11	5.04
T D	71.47	6.09	5.35
T C	70.30	6.33	4.72
T G	69.42	7.01	4.69

3.4. Nilai pH Durian dan Tempoyak

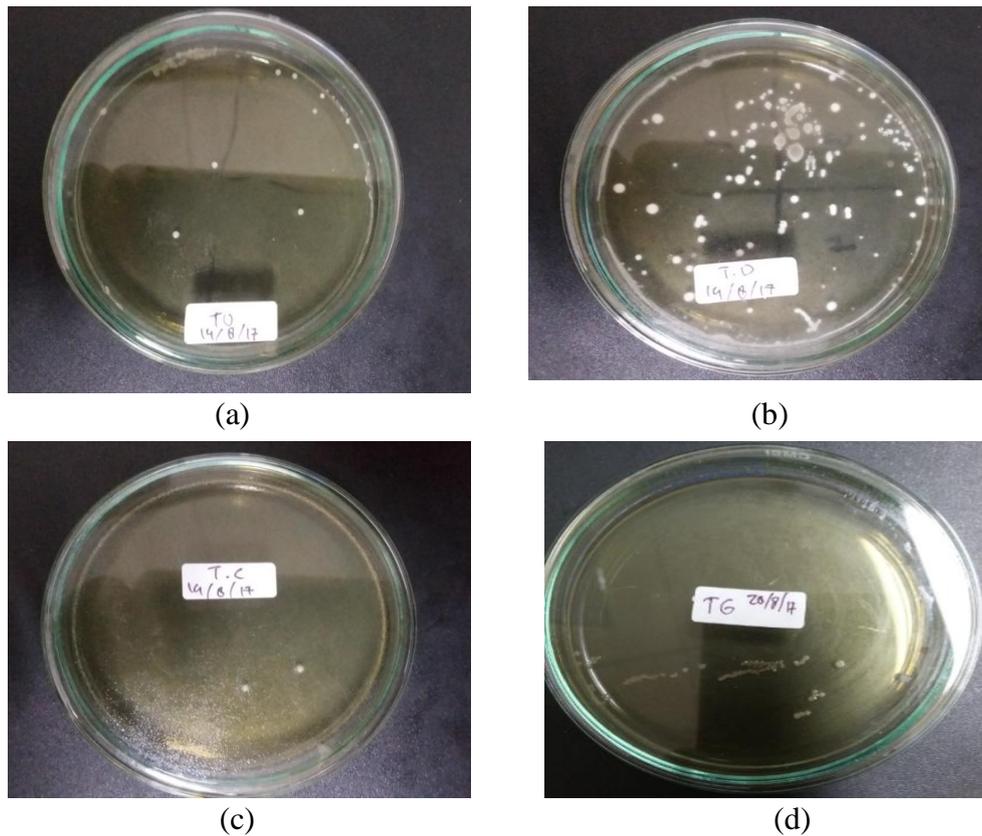
Pengukuran nilai pH terhadap durian segar, tempoyak yang dilakukan terhadap sampel menggunakan perlakuan fermentasi penambahan daun pisang (TD), tempoyak fermentasi penambahan cabe 3% (TC), tempoyak fermentasi penambahan garam 3% (TG), dan tempoyak fermentasi tanpa penambahan (original) (TO). Pengukuran pH bertujuan untuk mengetahui derajat keasaman yang dihasilkan.

Tabel 2. Nilai pH Durian dan Tempoyak

Sampel	Nilai pH
Durian segar	7.01
T O	3.89
T D	3.56
T C	4.59
T G	3.99

3.5. Total Koloni Bakteri Asam Laktat Tempoyak

Total koloni bakteri asam laktat dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas. Tempoyak yang telah melalui proses fermentasi selanjutnya dilakukan analisis mikrobiologi untuk isolasi dan identifikasi BAL yang terdapat pada tempoyak, yang mana bakteri tersebut akan digunakan sebagai probiotik pada sabun cair susu kambing ekstrak buah naga. Hasil total koloni bakteri asam laktat dari tempoyak dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. (a) Tempoyak original (tanpa penambahan), (b) Tempoyak penambahan daun pisang (c)Tempoyak penambahan cabe, (d)Tempoyak penambahan garam.

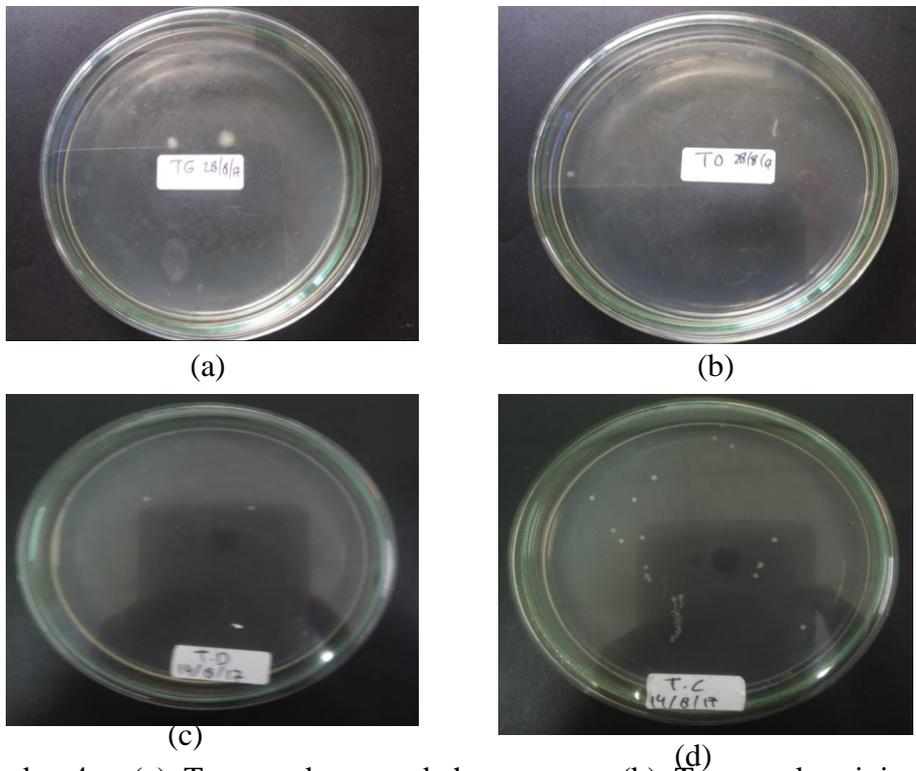
Table 3. Total Koloni Bakteri Asam Laktat Tempoyak (x 10⁸ CFU/ gr)

Sampel	Koloni Bakteri Asam Laktat
T O	16
T D	142
T C	2
T G	12

Pada Gambar 3. Merupakan hasil total koloni bakteri asam laktat. Plating ke Media MRS agar, dan Inkubasi an-aerob selama 24 jam suhu 37C. Total koloni bakteri dari tempoyak dengan tanpa penambahan (original) didapatkan total koloni BAL 16×10^8 CFU/g (Gambar. 3 (a)), tempoyak penambahan daun pisang dengan total koloni BAL 142×10^8 CFU/g (Gambar. 3 (b)), tempoyak penambahan cabe dengan total koloni BAL 2×10^8 CFU/g (Gambar. 3 (c)), tempoyak penambahan garam dengan total koloni BAL 12×10^8 CFU/g (d).

3.6. Total koloni Aerob Tempoyak

Total koloni aerob dilakukan di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas. Tujuan pengujian total koloni aerob untuk mengetahui mikroba aerob yang tumbuh selain BAL dan mikroba aerob ini sebagai mikroba yang tidak diharapkan, karena merupakan indikasi terjadinya kontaminasi. Sehingga dapat memperkirakan sampel pangan yang diuji masih baik atau tidak. Hasil total koloni bakteri aerob dari tempoyak dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. (a) Tempoyak penambahan garam. (b) Tempoyak original (tanpa penambahan), (c) Tempoyak penambahan daun pisang, (d) Tempoyak penambahan cabe.

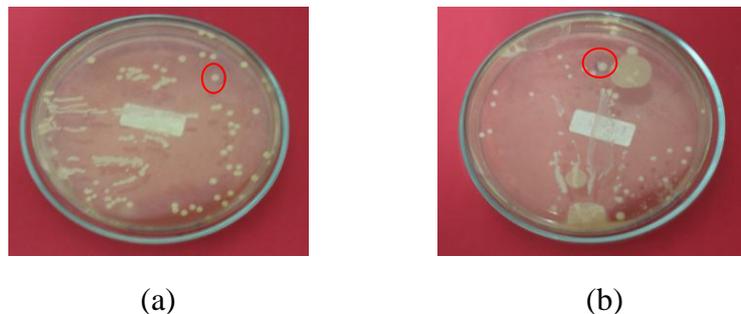
Table 4. Total Koloni Bakteri Aerob Tempoyak (x 10⁴ CFU/ gr)

Sampel	Koloni Bakteri Aerob
T O	2
T D	10
T C	15
T G	3

Pada Gambar 4. Total koloni aerob dikerjakan menggunakan pengenceran *pepton water* dan plating ke Media *Plate Count Agar* (PCA), dan Inkubasi aerob selama 24 jam suhu 37 °C. Total koloni bakteri dari tempoyak dengan penambahan garam didapatkan total koloni 3 x 10⁴ CFU/g (Gambar. 3 (a)), tempoyak tanpa penambahan (original) dengan total koloni 2 x 10⁴ CFU/g (Gambar. 3 (b)), tempoyak penambahan daun dengan total koloni 10 x 10⁴ CFU/g (Gambar. 3 (c)), tempoyak penambahan cabe dengan total koloni 15 x 10⁴ CFU/g (Gambar. 3 (d)). Standarisasi SNI batasan maksimum cemaran mikroba pada jenis pangan tempoyak belum ada ditentukan oleh Badan Standarisasi Nasional. Tetapi jika dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Yuliana (2007) total aerob tempoyak dari Lampung yang didapatkan adalah dengan rata-rata 10¹¹CFU/g yaitu 6.11 x 10¹¹CFU/g. Hasil total koloni aerob yang didapatkan masih lebih rendah dibandingkan penelitian sebelumnya.

3.7. Identifikasi Morfologi Isolat BAL

Setelah BAL diisolasi, ditemukan 2 isolat BAL dengan ciri-ciri berbentuk bulat, licin dan berwarna krem. Setelah itu, dilanjutkan dengan mengidentifikasi morfologi BAL yang diseleksi. Identifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil total koloni bakteri aerob dari tempoyak dapat dilihat pada gambar 5.



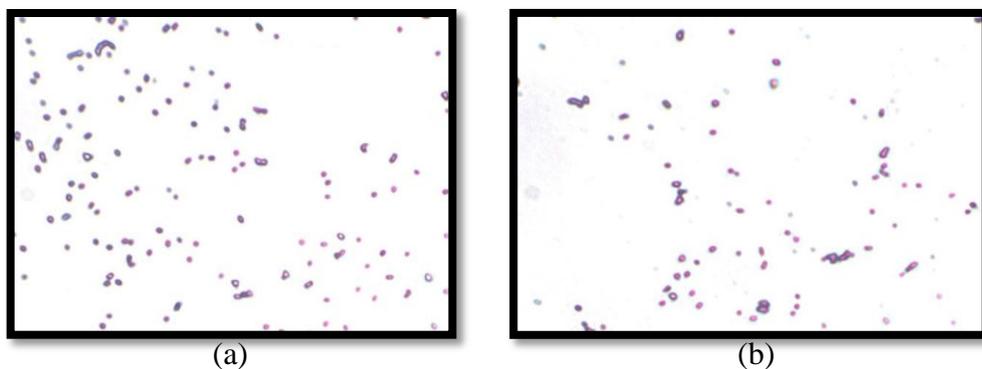
Gambar 5. (a) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD). (b) Tempoyak original (TO).

Hasil pengamatan isolat BAL secara makroskopis terlihat pada Tabel 5 dibawah ini.

Tabel 5. Karakteristik morfologi isolat BAL tempoyak asal Kabupaten Padang Pariaman

Isolat	Identifikasi Makroskopis				
	Warna	Bentuk	Ukuran	Pinggir	Permukaan
TO	Putih-krem	Bulat	1.5 mm	Rata, halus	Licin, cembung
TD	Putih krem	Bulat	1 mm	Rata, halus	Licin, cembung

Pengamatan secara makroskopis (bentuk, ukuran dan warna) BAL ditemukan koloni berwarna putih krem, berbentuk bulat dan memiliki elevasi cembung dengan tepian licin pada media MRS Agar MERCK. Setelah pengamatan secara makroskopis, dilakukan pemurnian sampai dua kali pemurnian sebagai stok bakteri yang akan digunakan untuk uji selanjutnya, yaitu identifikasi mikroskopis. Identifikasi mikroskopis pada penelitian ini yaitu dengan melakukan pengamatan sifat fisiologis isolat BAL. pengamatan yang dilakukan dengan uji Gram. Uji Gram dilakukan untuk menentukan bakteri merupakan Gram positif atau Gram negatif yang ditandai dengan penyerapan warna reagen oleh bakteri. Apabila bakteri menyerap warna reagen *crystal violet* yaitu berwarna violet, bakteri tersebut merupakan Gram positif (+), sedangkan bakteri Gram negatif (-) menyerap warna reagen safranin yaitu berwarna merah. Hasil pewarnaan gram BAL yang diisolasi dari dadih asal Kabupaten Agam didapatkan dua bentuk morfologi bakteri yaitu berbentuk batang (*bacil*) dan bulat (*coccus*), seperti terlihat pada Gambar 6 dibawah ini.



Gambar 6. (a) Tempoyak original (tanpa penambahan) (b) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun.

Hasil pewarnaan gram pada masing-masing isolat BAL yang didapatkan dalam penelitian adalah bakteri Gram Positif (+) seperti pada Gambar 6. diatas. Hal ini dicirikan dengan bakteri yang menyerap warna violet dari *crystal violet* dan memiliki bentuk batang bulat (*coccus*). Hal ini sesuai dengan pernyataan Unus (2005) yang menyatakan bahwa bakteri gram positif akan mengambil warna *crystal 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 bakteri gram negatif.

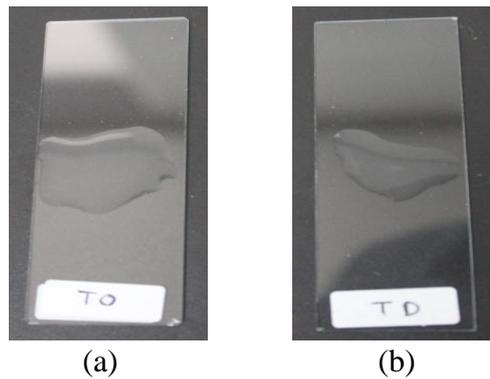
3.8. Uji Katalase BAL

Pengujian biokimia BAL dilakukan dengan uji katalase. Uji katalase dilakukan pada isolat BAL dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Uji biokimia ini dilakukan dengan cara meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) pada ulasan bakteri di atas kaca preparat. Uji katalase isolat BAL seperti pada Tabel 2.

Tabel 6. Uji katalase isolat BAL Tempoyak

No.	Isolat	Katalase
1	T D	- (Negatif)
2	T O	- (Negatif)

Pengamatan yang dilakukan adalah muncul tidaknya gelembung gas pada ulasan bakteri . Jika gelembung gas muncul menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan katalase positif, sedangkan tidak munculnya gas merupakan katalase negatif. Sebagaimana ciri-ciri BAL secara umum adalah memiliki pewarnaan Gram positif, bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Hasil penelitian yang telah dilakukan pada ketujuh belas isolat memiliki katalase negatif yang ditandai dengan tidak munculnya gelembung gas pada ulasan bakteri yang ditetesi H_2O_2 . Hasil uji katalase dari tempoyak dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. (a) Tempoyak original (TO) (b) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD)

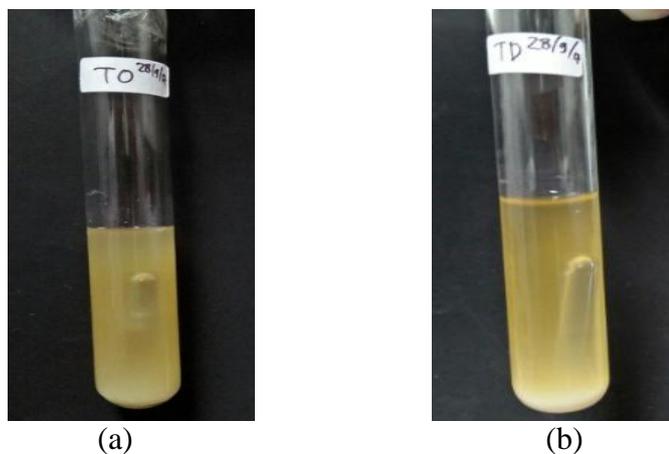
3.9. Uji Tipe Fermentasi

Selain uji katalase, uji biokimia lainnya adalah uji tipe fermentasi. Tujuan pengujian ini adalah untuk menggolongkan BAL termasuk ke dalam kelompok homofermentatif atau kelompok heterofermentatif. Pengamatan dilakukan dengan melihat terbentuknya gelembung udara pada tabung durham. Hasil pengujian tipe fermentasi pada masing-masing isolat BAL tempoyak asal Kabupaten Padang Pariaman seperti terlihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 7. Uji tipe fermentasi isolat BAL tempoyak asal Kabupaten Padang Pariaman

No.	Isolat	Homofermentatif	Heterofermentatif
1	TO	-	✓
2	TD	✓	-

Hasil uji tipe fermentasi dari tempoyak dapat dilihat pada gambar 8



Gambar 8. (a) Tempoyak original (TO) (b) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).

Hasil penelitian yang didapatkan yaitu isolat BAL asal tempoyak Kabupaten Padang Pariaman merupakan bakteri tipe homofermentatif pada tempoyak perlakuan fermentasi penambahan daun pisang (TD) yaitu bakteri yang produk utamanya merupakan asam laktat. Kemudian tipe heterofermentatif pada tempoyak perlakuan fermentasi tanpa penambahan (TO) yaitu selain asam laktat juga menghasilkan etanol, asam lain seperti asam asetat serta gas CO₂, sehingga apabila bakteri asam laktat yang diuji menghasilkan gas yang tertampung dalam tabung Durham, bakteri asam laktat tersebut dinyatakan sebagai heterofermentatif.

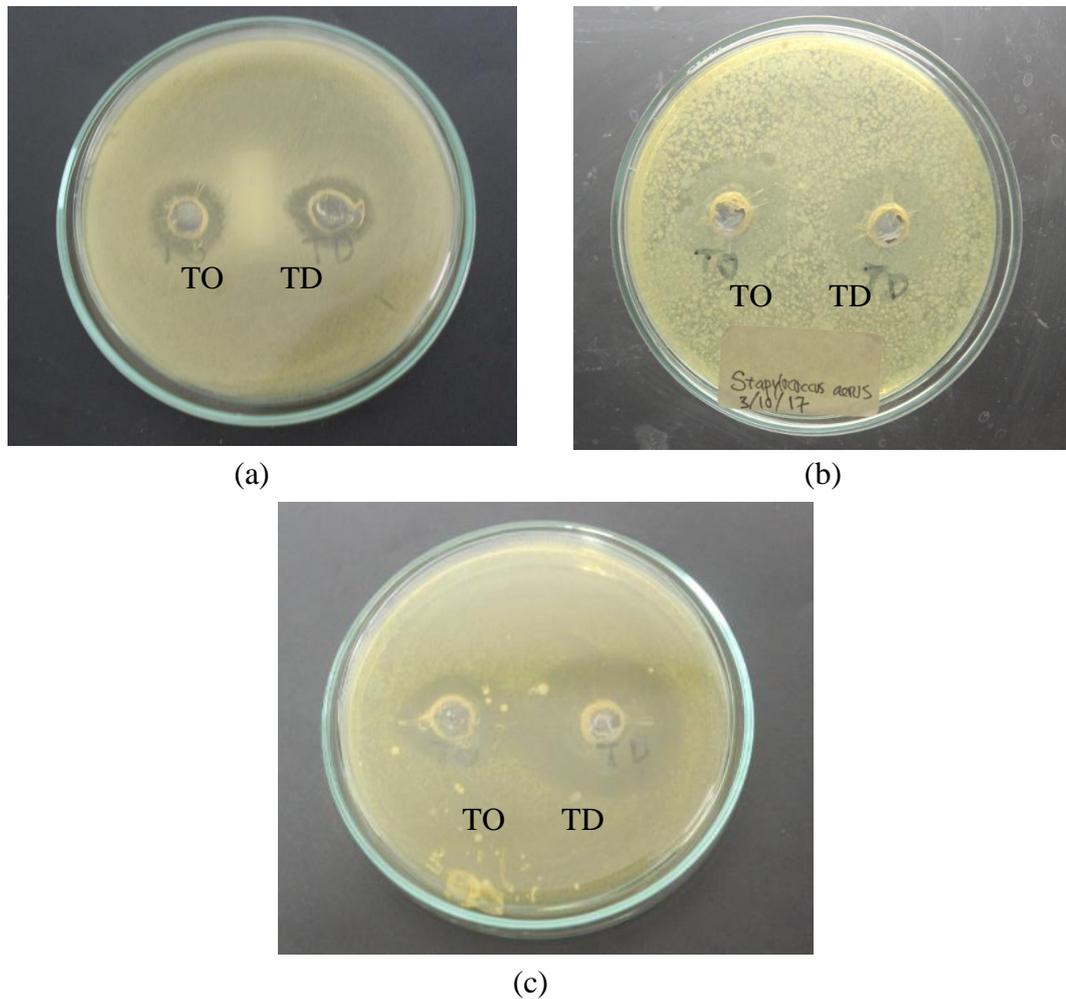
3.10. Skrining BAL Potensial Antimikrobia

Skrining isolat BAL dilakukan dengan tujuan untuk menyeleksi dan mendapatkan isolat BAL paling potensial yang akan dijadikan kandidat probiotik. Proses skrining dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan metode sumur difusi. Pada penelitian ini tidak menggunakan control positif seperti antibiotik karena pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL yang ditemukan dalam upaya menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Diameter zona bening yang terbentuk pada masing-masing isolat BAL seperti pada Tabel 4 dibawah ini.

Tabel 8. Diameter zona bening uji resistensi antimikroba (mm)

No.	Isolat BAL	Diameter Zona Bening (mm)		
		<i>E. coli</i> O ₁₅₇	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
1	TD	13,3	20,3	27,3
2	TO	12,3	19,3	17,3

Hasil zona bening uji resistensi antimikroba dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. (a) zona bening resistensi terhadap *E. coli* O157 (b) zona bening resistensi terhadap *S. aureus* (c) zona bening resistensi terhadap *L. monocytogenes*.

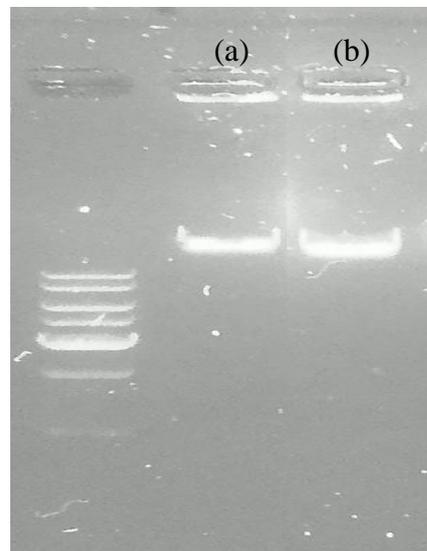
Isolat BAL asal Kabupaten Padang Pariaman memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi terhadap bakteri patogen (*E. coli* O₁₅₇, *S. aureus* ATCC 25923 dan *L. monocytogenes*). Isolat BAL yang memiliki zona hambat terbesar pada *Listeria monocytogenes* dimiliki oleh isolat TD dengan diameter 27,3 mm, sedangkan terendah adalah isolate TO yaitu 12,3 mm terhadap bakteri *E. coli*.

3.11. Bakteriosin Bakteri Asam Laktat



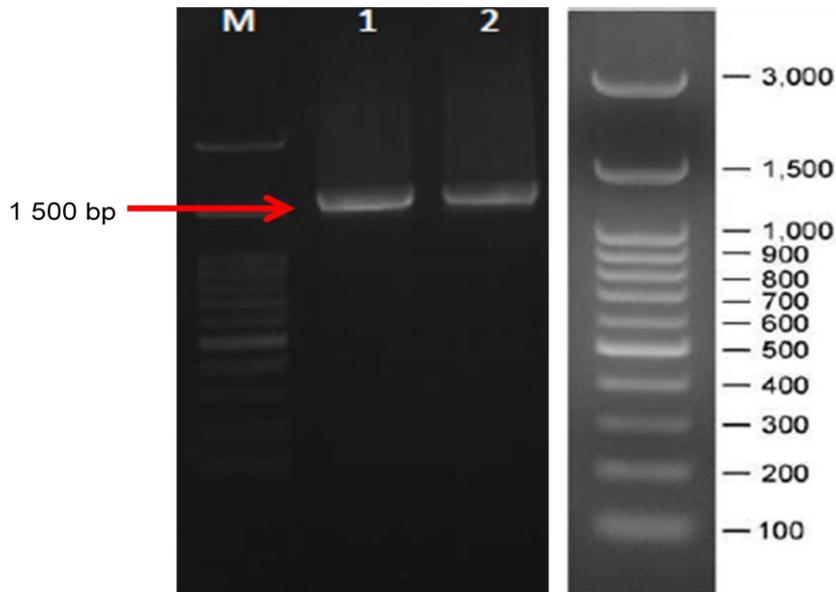
Gambar 10. Hasil Bakteriosin

3.12. Ekstraksi Genom Bakteri Asam Laktat Tempoyak



Gambar 11. Hasil Ekstraksi Genom Bakteri Asam Laktat (a) Tempoyak original (TO) (b) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).

3.13. Hasil PCR 16S rRNA



Gambar 12. Hasil PCR (1) Tempoyak original (TO) (2) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).

3.14. Analisis Data Sekuensing DNA BAL Tempoyak

Assembly of 2 sequences 1414 bp						
1	CAGTCGACGC	GTGGCCCAA	TTGATTGATG	GTGCTTGAC	CTGATTGATT	TTGGTCGCCA
61	ACGAGTGGCG	GACGGGTGAG	TAACACGTAG	GTAACCTGCC	CAGAAGCGGG	GGACAACATT
121	TGGAAACAGA	TGCTAATACC	GCATAACAGC	GTTGTTTCGCA	TGAACAACGC	TTAAAAGATG
181	GCTTCTCGCT	ATCACTTCTG	GATGGACCTG	CGGTGCATTA	GCTTGTTGGT	GGGGTAATGG
241	CCTACCAAGG	CGATGATGCA	TAGCCGAGTT	GAGAGACTGA	TCGGCCACAA	TGGGACTGAG
301	ACACGGCCCA	TACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATC	TTCCACAATG	GGCGCAAGCC
361	TGATGGAGCA	ACACCGCGTG	AGTGAAGAAG	GGTTTCGGCT	CGTAAAGCTC	TGTTGTTAAA
421	GAAGAACACG	TATGAGAGTA	ACTGTTTCATA	CGTTGACGGT	ATTTAACCAG	AAAGTCACGG
481	CTAACTACGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GTAGGTGGCA	AGCGTTATCC	GGATTATTG
541	GGCGTAAAGA	GAGTGCAGGC	GGTTTTCTAA	GTCTGATGTG	AAAGCCTTCG	GCTTAACCGG
601	AGAAGTGCAT	CGGAAACTGG	ATAACTTGAG	TGCAGAAGAG	GGTAGTGGAA	CTCCATGTGT
661	AGCGGTGGAA	TGCGTAGATA	TATGGAAGAA	CACCAAGTGGC	GAAGGCGGCT	ACCTGGTCTG
721	CAACTGACGC	TGAGACTCGA	AAGCATGGGT	AGCGAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC
781	ATGCCGTAAG	CGATGAGTGC	TAGGTGTTGG	AGGGTTTCCG	CCCTTCAGTG	CCGGAGCTAA
841	CGCATTAAAG	ACTCCGCCTG	GGGAGTACGA	CCGCAAGGTT	GAAACTCAAA	GGAATTGACG
901	GGGGCCCGCA	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTCGAA	GCTACGCGAA	GAACCTTACC
961	AGGTCTTGAC	ATCTTGCGCC	AACCCTAGAG	ATAGGGCGTT	TCCTTCGGGA	ACGCAATGAC
1021	AGGTGGTGCA	TGGTCGTCGT	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTTAAGT	CCCGCAACGA
1081	GCGCAACCCT	TGTTACTAGT	TGCCAGCATT	AAGTTGGGCA	CTCTAGTGAG	ACTGCCGGTG
1141	ACAAACCGGA	GGAAGGTGGG	GACGACGTCA	GATCATCATG	CCCCTTATGA	CCTGGGCTAC
1201	ACACGTGCTA	CAATGGACGG	TACAACGAGT	CGCGAACTCG	CGAGGGCAAG	CAAATCTCTT
1261	AAAACCGTTC	TCAGTTCGGA	CTGCAGGCTG	CAACTCGCCT	GCACGAAAGTC	GGAATCGCTA
1321	GTAATCGCGG	ATCAGCATGC	CGCGGTGAAT	ACGTTCCCGG	GCCTTGATACA	CACCGCCCGT
1381	CACACCATGA	GAGTTTGTA	CACCCAAAGT	CGGT		

Gambar 13. Hasil sekuen (1) Tempoyak original (TO)

Assembly of 2 sequences 1415 bp

```

1   TTGATTGATG GTGCTTGCAC CTGATTGATT TTGGTCGCCA ACGAGTGGCG GACGGGTGAG
61  TAACACGTAG GTAACCTGCC CAGAAGCGGG GGACAACATT TGGAAACAGA TGCTAATACC
121 GCATAACAGC GTTGTTCGCA TGAACAACGC TAAAAAGATG GCTTCTCGCT ATCACTTCTG
181 GATGGACCTG CGGTGCATTA GCTTGTGTGGT GGGGTAACGG CCTACCAAGG CGATGATGCA
241 TAGCCGAGTT GAGAGACTGA TCGGCCACAA TGGGACTGAG ACACGGCCCA TACTCCTACG
301 GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCACAATG GGCGCAAGCC TGATGGAGCA ACACCGCGTG
361 AGTGAAGAAG GGTTCGGCT CGTAAAGCTC TGTTGTTAAA GAAGAACACG TATGAGAGTA
421 ACTGTTCATA CGTTGACGGA TTTAACCAGA AAGTCACGGC TAACTACGTG CCACAGCCGC
481 GGTAAATACGT AGGTGGCAAG CGTTATCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGAGA GTGCAGGCGG
541 TTTTCTAAGT CTGATGTGAA AGCCTTCGGC TTAACCGGAG AAGTGCATCG GAAACTGGAT
601 AACTTGAGTG CAGAAGAAGG TAGTGGAATC CCATGTGTAG CGGTGGAAATG CGTAGATATA
661 TGGAGAACA CCAGTGGCGA ACGCGGCTAC CTGGTCTGCA ACTGACGCTG AGACTCGAAA
721 CATGGGTAG CGAACAGGAT TAGATACCTT GGTAGTCCAT GCCGTAACG ATGAGTCTA
781 GGTGTTGGAG GGTTCCGCC CTCAGTGCC GGAGCTAACG CATTAAAGCAC TCCGCTGGG
841 GAGTACGACC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG
901 CATGTGGTTT AATTGGAAGC TACGCGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CTTGCGCCAA
961 CCCTAGAGAT AGGGCGTTT CTTCGGGAAC GCAATGACAG GTGGTGCATG GTCGTCGTCA
1021 GCTCGTGTG TGAGATGTTG GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTG TTACTAGTTG
1081 CCAGCATTAA GTTGGGCACT CTAGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA
1141 CGACGTCAGA TCATCATGCC CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGACGGTA
1201 CAACGAGTCG CGAACTCGCG AGGGCAAGCA AATCTCTTAA AACCGTTCTC CATTCTGGACT
1261 GCAGGCTGCA ACTCGCTGC ACGAAGTCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT GAGTATGCCG
1321 CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA
1381 CCCAAGTCG GTGGGGTAAC CTTTAGGAGC CAGCC

```

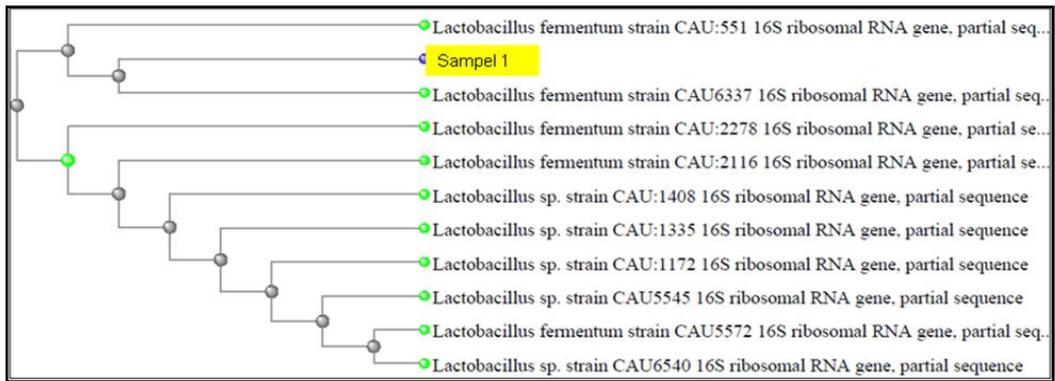
Gambar 14. Hasil sekuen (2) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU6337 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2547	2547	99%	0.0	100%	MF424232.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sp. strain CAU6540 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF424555.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU5572 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF357646.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sp. strain CAU5545 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF357619.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU:551 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF355152.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sp. strain CAU:1172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF355072.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sp. strain CAU:1335 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF355039.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sp. strain CAU:1408 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF354967.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU:2116 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF354713.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU:2278 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	100%	0.0	99%	MF354642.1

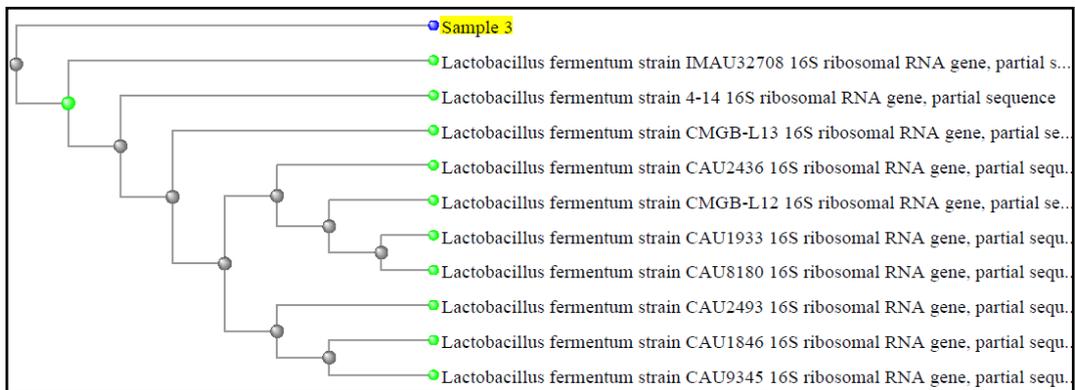
Gambar 15. Hasil Blast (1) Tempoyak original (TO)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU2436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	MF582785.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CMGB-L13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	MF348225.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CMGB-L12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	MF348224.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 4-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	KY435722.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain IMAU32708 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	KF149376.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU9345 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2529	2529	99%	0.0	99%	MF429754.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU1846 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2529	2529	99%	0.0	99%	MF424311.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU2493 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2529	2529	99%	0.0	99%	MF424005.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU1933 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	99%	MF429398.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain CAU8180 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	99%	MF425417.1

Gambar 16. Hasil Blast (2) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).



Gambar 17. Hasil Pohon Filogenetik (1) Tempoyak original (TO)



Gambar 18. Hasil Pohon Filogenetik (2) Tempoyak fermentasi dengan penambahan daun (TD).

Tabel 9. Hasil Analisis Data Sekuensing DNA

No.	Sampel	Hasil
1	1	Lactobacillus fermentum strain CAU6337
2	2	Lactobacillus fermentum strain IMAU32708

DAFTAR PUSTAKA

- Apriantono, A.D., N. Fardiaz, Puspitasari, Sendanawarti dan S. Budiyanono. 1989. Analisis Pangan. Intitut Pertanian Bogor Press, Bogor.
- Daulay D. 2000. Fermentasi Keju. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Depson, R. 2012. Identifikasi Molekuler dan Pengaruh Pemberian Potensial Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Dadih Terhadap Kolesterol Daging Itik Bayang Sumber Daya Genetik Sumatera Barat. [diakses 23 juli 2016].
- Ekowati, C.N. 2006. Suksesi Mikroba dan Pembentukan Asam Organik Pada Fermentasi Buah Durian (*Durio Zibethiunus* Murr). Research Report dari LAPTUNI-LAPP. UNILA. Lampung.
- Hanum S. 2000. Tinjauan Awal pada Komposisi Kimia Tempoyak yang Beredar di Pasar Kotamadya Palembang. Laporan Penelitian Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Huang, Yu-Ching., Chang, Yung-Ho., dan Shao Yi-Yuan. 2005. Effect of Genotype and Treatment on The Antioxidant Activity of Sweet Potato in Taiwan. Journal Food Chemistry. Vol. 98:29-38.
- Marteu, P. 2002. Stability of Anthocyanin in Food. Ch.6. In “Anthocyanin as Food Colors”, P. Markakis (Edu.). Academic Press. New York.
- Mustopa, A. 2009. Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler. Pusat Penelitian Bioteknologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.
- Purwanto, H. 2012. Identifikasi DNA dan Gen Resisten Terhadap Virus AI (*Avian Influenza*) pada Itik Pitalah sebagai Sumber Daya Genetik Sumatera Barat dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). [Tesis]. Padang. Fakultas MIPA. Universitas Andalas.
- Purwati, E., S. Syukur, dan Z. Hidayat.** 2005. *Lactobacillus sp.* Isolasi dari Bivicophitomega sebagai Probiotik. Di dalam Proceeding Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta.
- Purwati, E. dan Syukur, S.** 2006. Peranan pangan probiotik untuk mikroba Patogen dan kesehatan. Dipresentasikan pada Dharma Wanita Persatuan Propinsi Sumatera Barat, Padang, 8 Agustus 2006.
- Purwati, E., Arief dan A. Rahmadi.** 2011. Teknologi Dadiah. Cendekia, Bogor. ISBN 978-979-15949-8-1.
- Purwati, E., S. Syukur, Husmaini, H. Purwanto dan R.P. Pasaribu,** 2014. Molekuler Karakteristik Bakteri Asam Laktat Isolate Dadih Air Dingin Kabupaten Solok Sumatera Barat. Jurnal Vol. 40. No.2. Hal. 134-146
- Purwati, E., S. N. Aritonang, S. Melia, I. Juliyarsi dan H. Purwanto.** 2016. Manfaat Probiotik Bakteri Asam Laktat Dadiah Menunjang Kesehatan

Masyarakat. Lembaga Literasi Dayak (LID), Tangerang. ISBN 978-602-6381-09-5

- Senja, R. Y., Issusilaningtyas, E., Nugroho, A. K. dan Setyowati. 2014. Perbandingan metode ekstraksi dan variasi pelarut terhadap rendemen dan aktivitas antioksidan ekstrak kubis ungu (*Brassica oleracea L. Var. Capitata. F. Rubra*). *Traditional Medicine Journal*, Vol. 19(1): 43-48.
- Sodiq, A dan Z. Abidin. 2008. Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Etawa . Agromedia Pustaka , Tangerang.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2000. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta.
- Suryani, I., A. Santoso dan M. Juffrie. 2010. Penambahan agar-agar dan pengaruhnya terhadap kestabilan dan daya terima susu tempe pada mahasiswa politeknik kesehatan jurusan gizi Yogyakarta. *Jurnal gizi klinik Indonesia* 7 (2): 85 – 91.
- Surtiningsih. 2005. Cantik dengan Bahan Alami: Cara Mudah, Murah, dan Aman untuk Mempercantik Kulit. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Svobodova, A., J. Psotova., D. Walterova. 2003. Natural Phenolics in the Prevention of UV-Induced Skin Damage. *Biomed. Pap.* 147:137-145.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi ke-2 Cetakan-2 Alihbahasa. B. Soemantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tadros, T. F. 2005. *Applied Surfactants: Principles and Applications, I*, 259. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co.KGAA. Weinheim.
- Trisno, J. Bahan Ajar Bioteknologi. [Bahan%20Ajar%20Biotek%20Perlintan.pdf](#). [diakses 17 Juli 2017].
- World Health Organisation (WHO). 2002. Veterinary public health. Diakses 27 Juni 2016 dari <http://www.who.int/>.
- Wicchienchot S, Jatupornpipat M, Rastall RA. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem* 120 : 857. DOI: 10.1016/j. foodchem. 209.11.02.6
- Yang, E., L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette dan S. Fillmore. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin – producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yoghurts. *AMB Express* 2012, 2 : 48. <http://www.amb-express.com/content/2/1/48>.

LAMPIRAN

Hasil Submitted Jurnal Tempoyak

Characterization of Lactic Acid Bacteria and Determination Study of Antimicrobial Activity From Tempoyak in Padang Pariaman Districts, West Sumatera, Indonesia

Endang Purwati¹, Yuherman¹, Indri Juliyarsi¹, Puji Hartini², Akmal Djamaan³ and Hendri Purwanto¹

¹Laboratory Biotechnology of Technology of Animal Product Processing, Faculty of Animal Science, Andalas University, Limau Manis, Padang, Indonesia

²Post Graduate Student, Department of Science, Andalas University, Limau Manis, Padang, Indonesia

³Laboratory Biota Sumatera, Faculty of Mathematic and Science, Andalas University, Limau Manis, Padang, Indonesia

Email : purwati17@yahoo.co.id

ABSTRACT

Tempoyak is a traditional fermented condiment made from the pulp of the durian fruit (*Duriozibethinus*). This study aims to determine the characteristic lactic acid bacteria (LAB) from tempoyak in Padang Pariaman regency, West Sumatera, in microscopic, macroscopic, molecular identification, and tested for antimicrobial activity by using *Escheria Coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Lysteria monocytogene* as indicator bacteria by agar well diffusion method. The largest inhibitory zone was obtained from isolated code TO (19.3 mm) to *Staphylococcus aureus*, 17.3 mm to *Lysteria monocytogene*, and the lowest inhibitory to *Escheria Coli* (12.3 mm). PCR results showed that DNA fragment is 1500 bp. The sequence results from isolate tempoyak code TO showed that LAB isolate was *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: Lactic acid bacteria, tempoyak, *Lactobacillus plantarum*

INTRODUCTION

Background

Tempoyak is the fermented pulp of durian fruit that has distinctive durian smell and a creamy yellow color and is widely consumed in both Malaysia and Indonesia as side dish and condiment (Battcock and Ali, 1998; Irwandi and Che-Man, 1996; Gandjar, 2000). As a condiment, tempoyak is used with certain fish and vegetables dishes. This condiment is made by mixing durian pulp with salt and fermented under partially anaerobic condition at ambient temperature in a closed container. Fermentation usually takes about 4-7 days and the texture of durian pulp changes from a solid to a semisolid consistency with acid odor and dominant taste. The acidity of tempoyak was reported as approx. 2.8 to 3.6% (Leisner *et al.*, 2002). The sour taste of tempoyak is attributed to the acid produced by lactic acid bacteria (LAB) during fermentation. Earlier studies showed that LAB were the predominant microorganism in tempoyak (Leisner *et al.*, 2001; Amiza *et al.*, 2006). Species of *Lactobacillus* have been reported as the main LAB isolated from tempoyak made in Indonesia and Malaysia. It is

expected that strains of LAB and other microorganisms vary depending on the place where the product is prepared. Wirawati (2002) isolated *Lb. casei*, *Lb. corynebacterium* and *Lb. casei*, respectively, from tempoyak in Indonesia.

There are several potential health and nutritional benefits from LAB which are sometimes known as "probiotics". Bacteria that lives in the human intestine and control the balance of intestinal microflora finally elicit physiological and beneficial effects on health of the host have been recently been named as "probiotics". Probiotics as 'living microorganisms, which upon ingestion in certain number, exert health benefits beyond inherent basic nutrition'. Probiotics have been suggested to have the following properties and functions: adherence to host epithelial tissues; acid resistance and bile tolerance; elimination of pathogens or reduction in pathogen adherence; production of acids, hydrogen peroxide and bacteriocin antagonistic to pathogen growth; safety, non-pathogenic and non-carcinogenic; and improvement of intestinal microflora (Saito, 2004).

Hasil Paten Merek Dagang YOLIP

D002016062186*** 16/12/2016 10:15:39***LESMANA*** 2,000,000.00*** 128***16/12/2016



Lembar IV

PERMINTAAN PENDAFTARAN MEREK

* Tgl. Masuk :	* Untuk Permintaan Merek : BARANG
* No. Agenda :	* Tgl. Penerimaan Permintaan :
Nama Kewarganegaraan dan alamat Pemilik Merek :	Yuherman, SE. ALAMAT RUMAH : Jl. Jawa Gadut RT 002/ RW 001 Kelurahan Limau Manis Kecamatan Pauh, Kota Padang
Nama dan alamat kuasa :	Prof. drh. Hj. Endang Purwati R N, MS., Ph.D. ALAMAT RUMAH : Jl. Bakti No. 2/3 RT 005/ RW 007 Kelurahan Parupuk Tabing, Kecamatan Koto Tengah Kota Padang, 25171 ALAMAT KORESPONDENSI : LPPM Kampus Unand Limau Manis, Padang 25163
Alamat yang dipilih di Indonesia (Diisi untuk pemilik merek yang tidak bertempat tinggal di Indonesia) :	-
Nama Negara dan tanggal permintaan Pendaftaran merek yang pertama kali (Diisi untuk permintaan pendaftaran yang dijjukan dengan hak prioritas). Warna-warni etiket :	-
Ungu, Putih	Etiket merek  
Arti bahasa/huruf/angka Asing dalam etiket merek :	
YOLIP = Yogurt Limau Manis Padang	
Kelas barang/jasa : 30, 41.	
Jenis barang/jasa : Cair, Susu, Krim, Minuman, Fermentasi, Yogurt	
* diisi oleh kantor merek	PADANG, 30 NOVEMBER 2016 Kuasa, 
Tanda tangan :	
Nama lengkap :	Prof. drh. Hj. Endang Purwati R N, MS., Ph.D.



Laboratorium Mikrobiologi Molekuler Bioteknologi



Mesin PCR