

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**  
**PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR**  
**UNTUK SARJANA UNGGUL**



**POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI PROBIOTIK ISOLASI**  
**DARI IKAN FERMENTASI UNTUK PANGAN FUNGSIONAL DAN**  
***BIODEGRADABLE***

**TIM PENGUSUL**

**Prof. Drh. Hj. Endang Purwati RN, MS, Ph.D**

**NIDN 0017035106**

**Prof. Dr. Sc.agr. Ir. Jamsari, MP**

**NIDN 0002026809**

**Yudha Endra Pratama**

**NIM 1720652011**

**FAKULTAS PETERNAKAN**

**UNIVERSITAS ANDALAS**

**November, 2018**



## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Potensi Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik Isolasi  
Dari Ikan Fermentasi Untuk Pangan Fungsional Dan  
Biodegradable

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : drh. ENDANG PURWATI RN,  
Perguruan Tinggi : Universitas Andalas  
NIDN : 0017035106  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Bioteknologi  
Nomor HP : 081267529701  
Alamat surel (e-mail) : purwati17@ansci.unand.ac.id/purwati17@yahoo.co.id

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : Ir JAMSARIMP  
NIDN : 0002026809  
Perguruan Tinggi : Universitas Andalas

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : Yudha Endra Pratama  
NIDN :  
Perguruan Tinggi :

**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000



(Prof. Dr. James Hellyward, MS)  
NIP/NIK 196107161986031005

Kota Padang, 12 - 11 - 2018  
Ketua,

(drh. ENDANG PURWATI RN, )  
NIP/NIK 195103171978032001



(Dr. Ing. Pyung Gatot, S. Dinata, M.T)  
NIP/NIK 196607091992031003

## RINGKASAN

Kemasan berperan penting dalam proses mengawetkan bahan pangan dan juga menambah nilai ekonomis dari produk tersebut. Penggunaan kemasan plastik tiap tahunnya mengalami peningkatan yang berdampak pada penumpukan limbah kemasan plastik. Plastik sangat sulit diuraikan serta membutuhkan waktu yang lama untuk terurai. Bahan dasar plastik berasal dari minyak bumi yang saat ini sangat terbatas kesediaannya. Pengembangan kemasan ramah lingkungan dari bahan organik menjadi solusi alternatif.

Salah satu kemasan ramah lingkungan berbahan dasar organik ialah kemasan *biodegradable* atau yang lebih dikenal dengan *edible packaging*. *Edible packaging* dikenal dengan dua macam yakni *edible coating* dan *edible film*, keduanya sama-sama kemasan primer yang bisa langsung dimakan oleh konsumen. *Edible packaging* juga merupakan kemasan ramah lingkungan dan *zero waste* sehingga membantu mengurangi penggunaan plastik. Umumnya *edible film* dan *coating* dapat dibuat dari bahan dasar yang bersifat hidrokoloid, lipid dan komposit serta bisa ditambahkan bahan lainnya seperti antioksidan, antimikroba, pewarna dan *flavour*.

Probiotik diketahui sebagai mikroorganisme yang memberikan keuntungan terhadap kesehatan hostnya apabila dikonsumsi sebagai *food supplement*. Probiotik dikenal sebagai bakteri baik dikarenakan memiliki zat antimikroba, tahan asam serta meningkatkan kemampuan penyerapan pada usus. Probiotik umumnya dikenal dari bakteri golongan Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL salah satunya dapat diisolasi dari jenis makanan fermentasi. Makanan tradisional dari Sumatera Barat yaitu ikan fermentasi dalam hal ini isolat yang digunakan *budu*, *pado* dan *boyom* dapat dijadikan sebagai isolat BAL.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat BAL dari ikan fermentasi asal Sumatera Barat yang dapat dijadikan sebagai sumber probiotik. Isolasi BAL dilakukan secara konvensional dan molekuler. Isolat BAL yang diperoleh diujikan aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri patogen. Isolat BAL dengan aktivitas antimikroba potensial ditambahkan dalam pembuatan *edible film* untuk meningkatkan umur simpan dari kemasan probiotik. Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan mulai dari isolasi BAL, pengujian BAL secara konvensional dan molekuler menggunakan 16s rRNA, sekuensing, identifikasi BAL, uji aktivitas antimikroba, serta pengamatan karakteristik dari *edible film* yang ditambahkan BAL secara sifat fisik dan kimia.

**Tahun pertama:** Pada tahun pertama penelitian ini akan melakukan isolasi dan identifikasi BAL yang berasal dari isolat ikan fermentasi asal Sumatera Barat. Isolasi BAL menggunakan media khusus MRS Agar sehingga BAL saja yang tumbuh. Pada metode identifikasi BAL akan dilakukan secara konvensional dan secara molekuler menggunakan 16S rRNA (ekstraksi genom, PCR dan sekuensing) kemudian dilakukan pengujian BAL sebagai penghasil probiotik yang dilakukan dengan metode konvensional dan metode molekuler. Selanjutnya dilakukan pengujian antimikroba terhadap bakteri patogen kemudian dipilih isolat dengan kemampuan yang baik dilihat dari daya tahan terhadap pH, temperatur, garam empedu dan NaCl untuk selanjutnya diaplikasikan kepada produk.

Keyword : Bakteri Asam Laktat, *Edible film whey*, Probiotik, *Biodegradable*, Pangan Fungsional

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1. Latar Belakang**

Dewasa ini penggunaan kemasan plastik di Indonesia terus meningkat. Peningkatan pemakaian kemasan plastik tentunya juga akan berdampak pada jumlah limbah plastik. Kemasan plastik umumnya digunakan untuk keperluan sehari-hari. Menurut data dari Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan (2016) dalam satu tahun 100 gerai/toko anggota APRINDO menghasilkan 10,95 juta lembar kantong plastik. Jumlah ini belum ditambah dengan limbah dari industri pangan, detergen, dan sebagainya. Penggunaan kemasan plastiknya tentunya berdampak pada kesediaan bahan bakunya seperti minyak bumi. Untuk itu perlu dilakukan pembaharuan sumber guna pengurangan pemakaian kemasan plastik terutama pada produk pangan. Oleh sebab itu pengembangan kemasan ramah lingkungan perlu ditingkatkan salah satunya dengan pengembangan kemasan *biodegradable* yang dikenal dengan *edible film*.

*Edible film* yang digunakan saat ini umumnya dapat dibuat dari bahan-bahan yang bersifat hidrokoloid, lipid dan komposit. Salah satu bahan yang bersifat hidrokoloid ialah *whey* protein. *Whey* umumnya merupakan limbah dari kasein atau pembuatan keju. Potensi pangan dan energi *whey* akan hilang apabila tidak dimanfaatkan, mengingat *whey* mengandung sekitar 55% total nutrisi dari susu (Vinderola *et al.*, 2000).

Untuk menjaga kestabilan daya simpan pada *edible film* biasa ditambahkan beberapa senyawa yang mengandung antimikroba, antioksidan, *flavour* serta pewarna. Umumnya antimikroba yang ditambahkan berasal dari senyawa alkaloid yang didapat dari ekstrak tanaman. Senyawa antimikroba bisa juga dihasilkan oleh bakteri yakni berasal dari Bakteri Asam Laktat (BAL) yang tentunya termasuk dalam kategori bakteri probiotik. Bakteri probiotik yang banyak dikenal termasuk kelompok bakteri asam laktat (BAL) dan termasuk mikroorganisme yang aman dan disebut *food grade microorganism* (Sumaryati, *et al.*, 2011).

Probiotik juga berperan di dalam pencernaan dan penyerapan nutrisi ke dalam tubuh. Selain melindungi tubuh dari ‘bakteri jahat/patogen’, probiotik juga memiliki beberapa peranan di dalam dunia kesehatan, diantaranya adalah membantu mengatasi diare (terutama yang disebabkan oleh rotavirus), mencegah dan mengatasi infeksi saluran kemih atau infeksi pada saluran reproduksi wanita, menangani *Irretable Bowel syndrome* (IBS), mencegah dan mengatasi dermatitis atopik

bagi anak-anak dan mengurangi rekurensi atau kekambuhan dari kanker kandung kemih (Soeharsono, *et al.*, 2010).

Bakteri Asam Laktat (BAL) umumnya berasal dari makanan fermentasi yang kemudian dilakukan isolasi dari isolat yang dipilih guna mengetahui strain bakteri yang didapatkan. Menurut Sumaryati, *et al* (2011) genus bakteri yang tergolong kepada BAL diantaranya *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lueconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, dan *Propionibacterium*. Untuk mengetahui strain dari BAL yang didapat maka dilakukan dengan cara identifikasi DNA bakteri secara molekular berbasis PCR menggunakan gen 16S rRNA.

Isolasi BAL yang berasal dari makanan tradisional asal Sumatera Barat yaitu ikan fermentasi belum banyak dilakukan. Beberapa jenis ikan yang melalui proses fermentasi baik secara spontan atau disengaja seperti halnya Budu Pariaman, Pado asal Pariaman dan Agam, Boyom asal Pasaman dan Ikan Tukai asal Pesisir Selatan. Oleh sebab itu perlu dilakukan identifikasi guna mengetahui jenis BAL yang terdapat pada ikan fermentasi tersebut serta mengetahui kemampuan BAL sebagai kandidat probiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menambah koleksi strain BAL yang bersifat probiotik asal Sumatera Barat, melihat aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri patogen pangan, serta aplikasinya dalam pangan fungsional (sosis dan permen susu), serta produk *edible film*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 1. State of the Art Bidang yang Diteliti

Istilah *edible film* mengacu pada struktur lapisan tipis komposisi biopolimer yang dapat dikonsumsi dan biasanya diterapkan ke permukaan produk makanan dengan mencelupkan, menyemprot atau menyikat (Bourtoom, 2008). Penerapan *edible film* dalam makanan sebelumnya telah terbukti efektif untuk mempertahankan laju kerusakan dengan memperlambat reaksi yang merugikan, misalnya enzimatik, fisik dan kimia dengan meningkatkan penghalang termodinamika atau fisik yang menghambat uap air, oksigen dan mobilitas soliter (Falguera, *et al.*, 2011). Selama dekade terakhir penelitian yang telah dilakukan ke dalam produksi film yang dapat dimakan dengan penghalang yang baik dan sifat mekanik dan tingkat biodegradabilitas yang tinggi. Baru-baru ini, film dan pelapis yang dapat dimakan telah diperkenalkan sangat efisien untuk pengiriman beberapa senyawa bioaktif, misal vitamin, antioksidan dan probiotik dalam sistem makanan (Kanmani & Lim, 2013; López de Lacey, López- Caballero, *et al.*, 2012).

Aplikasi *edible film* sebagai penghambat pertumbuhan mikroba patogen bahwa *edible film* yang dapat dimakan dengan penambahan probiotik, López de Lacey *et al.*, (2012). Diantara kategori makanan utama yang umum dikonsumsi, makanan probiotik memiliki pengaruh yang besar terhadap kesehatan usus. Produk makanan semacam itu dapat menjadi contoh yang bagus untuk menyoroti hubungan yang kuat antara makanan dan kondisi kesehatan. Permintaan konsumen akan makanan sehat terus meningkat, sehingga mendorong inovasi dan pengembangan produk baru dalam industri makanan di seluruh dunia. Ini telah meningkatkan perhatian para peneliti untuk mempelajari secara mendalam karakteristik khusus dari produk makanan tertentu dan pengaruhnya terhadap kesehatan manusia.

Organisasi Pangan dan Pertanian Perserikatan Bangsa-Bangsa / Organisasi Kesehatan Dunia (FAO / WHO) pada tahun 2002, mendefinisikan probiotik adalah "mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup, memberikan manfaat kesehatan pada tuan rumah" (Arya *et al.*, 2002). Anggota genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* adalah probiotik yang paling sering digunakan, sedangkan anggota genus *Streptococcus* dan *Enterococcus* mengandung beberapa patogen oportunistik (Salminen 1998 dalam Ogier *et al.*, 2008). Beberapa ragi seperti

*Saccharomyces boulardii* umumnya diterima untuk digunakan sebagai probiotik. Sektor susu telah memelopori pengenalan probiotik, sehingga produk susu tetap menjadi bentuk yang paling populer untuk konsumsi probiotik ( De Prisco *et al.*, 2016). Isolasi BAL Yusra (2014) menggunakan gen 16s rRNA mendapatkan spesies BAL *bacillus cereus* HRV22 dari isolat *budu*.

Salminen *et al.* (2004) menyatakan bahwa terdapat beberapa kriteria yang harus dipenuhi oleh suatu probiotik, diantaranya adalah: (1) bersifat nonpatogenik dan mewakili mikrobiota normal pada usus inangnya, serta masih aktif pada kondisi asam lambung dan konsentrasi garam empedu yang tinggi dalam usus halus, (2) dapat tumbuh dan bermetabolisme dengan cepat serta terdapat dalam jumlah yang tinggi dalam usus halus, (3) mampu mengkolonisasi beberapa bagian dari saluran usus inangnya, (4) dapat memproduksi asam-asam organik secara efisien dan memiliki sifat antimikroba terhadap bakteri patogen, (5) mudah diproduksi, mampu tumbuh dalam sistem produksi skala besar, dan hidup selama kondisi penyimpanan.

Menurut Purwati, Aritonang, Melia, Juliyarsi dan Purwanto (2016) bakteri probiotik berarti suplemen mikroba hidup yang memberikan efek positif terhadap manusia dan hewan dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Habitat aslinya yaitu usus manusia maupun hewan. Syukur dan Purwati (2013) menambahkan bakteri probiotik mampu mereduksi pH di usus, melancarkan pencernaan dengan memproduksi beberapa enzim pencernaan dan vitamin, memproduksi substansi antibakteri, misalnya asam organik, bakteriosin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, asetaldehid, laktoperoksidase, laktose dan zat-zat lainnya, serta merekonstruksi mikroflora normal dalam usus.

Selama proses fermentasi BAL memproduksi asam organik, metabolit primer, dan menurunkan pH lingkungannya menjadi 3 - 4,5 sehingga dapat membunuh bakteri lain yang hidup pada kisaran pH 6 - 8. Di samping itu BAL mengekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), diasetil, CO<sub>2</sub>, asetaldehid, asam-asam amino dan bakteriosin (Syukur dan Purwati, 2013).

*Budu* yang berasal dari Sumatera Barat bukan merupakan nama jenis ikan, namun merupakan bentuk produk fermentasi yang diproduksi di daerah pesisir Kabupaten Padang Pariaman, Agam dan Pasaman. *Budu* biasanya terbuat dari ikan laut yang berukuran besar dan memiliki daging putih seperti ikan Tenggiri (*Scomberomorus guttatus*) dan ikan talang-talang (*Chorinemus tala*) (Yusra, 2012).



Ikan *pado* merupakan salah satu produk ikan fermentasi lokal yang berasal dari Sumatera Barat. Saat ini ikan *pado* sudah sulit ditemukan, hal ini disebabkan oleh cita rasa dan bau ikan *pado* yang khas, sehingga kurang disukai oleh generasi muda serta produsen dari ikan *pado* itu sendiri sudah mulai berkurang. Produk fermentasi ikan *pado* di Padang Pariaman hampir sama dengan ikan fermentasi *picungan* asal Banten. Huda (2012) menyatakan *Picungan* merupakan produk fermentasi ikan yang unik dan hanya bisa ditemukan di Provinsi Banten. *Picungan* mengacu pada proses fermentasi ikan menggunakan biji buah *simauang* (*Pangium edule Reinw*). Bahan utama *picungan* merupakan ikan laut diantaranya ikan kembung (*Rastrelliger sp*) ikan layang (*Decapterus sp*) ikan teri (*Stolephorus sp.*) dan ikan layur (*Trichiurus savala*).

## **2. Potensi Senyawa Antimikroba Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam Laktat (BAL) digunakan untuk proses fermentasi karena senyawa antibakteri (bakterisidal) yang dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat dapat menghambat mikroorganisme lainnya. 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 lingkungan 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 yang berperan penting dalam menjaga dan memperpanjang masa simpan produk (Syukur dan Purwati, 2013). Selain itu menurut Aritonang, Roza, Rossi, Purwati dan Husmaini (2017) tentang aktivitas antimikroba isolat BAL Okara terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*, hasil yang didapatkan terhadap BAL yaitu 5,06 mm – 9,10 mm.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan metode / kegiatan sebagai berikut:

*Tahun pertama (2018)*

#### 1. Pengambilan sampel

Ikan fermentasi Budu dari Padang Pariaman, Boyon dari Pasaman dan Pado dari Padang Pariaman Provinsi Sumatera Barat dimasukkan ke dalam *ice box* dan dibawa ke laboratorium.



(A)



(B)

Gambar 1. A;Ikan *pado* dari Kab. Padang Pariaman, B;Ikan *budu* dari Kab. Padang Pariaman, (Dokumentasi penelitian, 2018).

#### 2. Isolasi BAL dan Pewarnaan Gram

Isolasi BAL yang dilakukan berdasarkan metoda menurut Purwati dkk. (2005) sebagai berikut : Menggunakan sendok steril dan aluminium foil tempoyak ditimbang sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan 9 ml larutan MRS Broth dalam tabung reaksi, lalu divortex sampai homogen. Hasil ini disebut pengenceran 10-1 , dimasukkan ke dalam anaerobjar, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C; Hasil dari pengenceran pertama (10-1 ) tersebut diambil 1 ml (1000  $\mu$ l), kemudian 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 ; Dari pengenceran 10-7 diambil 100  $\mu$ l sampel dan ditanam dengan metode spread pada petridish yang telah berisi media MRS Agar, kemudian diratakan dengan hockeystick yang sebelumnya disteril dengan alkohol dan dibakar dengan bunsen lalu diangin-anginkan; Inokulum disimpan dalam anaerobjar kemudian diinkubasi

dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengkodean petridish dengan menandai masing-masing petridish; Setelah 48 jam, single colony yang mencirikan BAL yaitu bulat licin berwarna putih kekuningan dipindahkan ke media MRS Agar untuk pemurnian koloni dengan metode streak yaitu dengan menggunakan jarum ose kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C; Koloni yang mencirikan BAL dilakukan pewarnaan gram menurut prosedur Purwati dkk. (2005) sebagai berikut; 1) Diambil biakan bakteri dan bakteri diratakan di atas kaca benda (preparat) yang telah dibersihkan dengan alkohol, 2) lalu dikeringkan di atas bunsen atau alat pengering, 3) ditetesi dengan zat warna kristal violet, 4) kemudian ditunggu selama 1 menit agar zat warna meresap oleh bakteri, 5) lalu 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) setelah itu dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop dengan menggunakan minyak celup (minyak imersi).

### **3. Ekstraksi Genom Bakteri Gram Positif dengan KIT Promega (USA)**

Sampel isolat BAL yang single koloni dari MRS Broth dipipet sebanyak 1000 µl dan dimasukkan dalam eppendorf baru; Sentrifuse 14.000 rpm selama 2 menit. Lalu dibuang supernatan, pelet diambil, Ditambahkan 480 µl 50mM EDTA; Selanjutnya ditambahkan 120 µl Lysozyme; Inkubasi dalam waterbath 37°C selama 60 menit; Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm. Lalu dibuang supernatan, pelet diambil; Ditambahkan 600 µl nuclei lysis solution lalu dihomogenkan dengan micropipette, Inkubasi 80°C selama 5 menit. Lalu diamkan pada suhu ruang; Ditambahkan 3 µl RNase Solution, lalu dihomogenkan dan inkubasi dalam waterbath 37°C selama 60 menit; Ditambahkan 200 µl Protein precipitation solution lalu vortex; Inkubasi dalam es selama 5 menit; Sentrifuse selama 3 menit 14.000 rpm. Lalu pipet supernatannya dipindahkan pada eppendorf baru, pellet dibuang; Tambahkan 600 µl isopropanol lalu dihomogenkan; Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm, lalu diambil pellet, supernatan dibuang, Ditambahkan 600 µl ethanol 70% lalu dihomogenkan; Sentrifuse selama 2 menit 14.000 rpm, lalu diambil pellet, supernatan dibuang; Diangin-anginkan eppendorf yang berisi pellet tersebut selama 15 menit; Rehidrasi DNA pellet dengan ditambahkan 10 – 100 µl Rehydration solution selama 60 menit pada 65°C.

#### **4. PCR**

Persiapan primer PCR (16S rRNA) 1. PrimerR (16S-1492R, Tm 47°C, 5'GTT TAC CTT GTT ACG ACTT-3) dan F (16S- 27F, Tm 54.3°C, 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3), disiapkan (konsentrasi 10pM) 2. Ambil 90 µl dH<sub>2</sub>O + 10µl (Primer R dan F) (Catt : Primer R dan F dalam TE buffer (konsentrasi 100µM)

#### **5. Analisis Data Sekuensing**

Analisis data sequence dilakukan menggunakan program software DNA star. Untuk analisa sequence alignment, dilakukan dengan membandingkansequencing 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).

#### **6. Analisis Data Sekuensing**

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

#### **7. Resistensi Anti Mikroba BAL**

Resistensi anti mikroba BAL berdasarkan prosedur Mustopa (2009) sebagai berikut : Uji resistensi antimikroba BAL dilakukan terhadap lima bakteri uji yaitu Eschericia coli NBRC 14237, Staphylococcus aureus NBRC 13276, Bacillus subtilis BTCCB 612, Salmonella tyhpiidan Lysteria monocytogenesis (Koleksi Pusat Penelitian Kimia LIPI Bandung); Kultur BAL 3 ml disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C, kemudian supernatannya digunakan untuk resistensi antimikroba; Bakteri uji 200 µl yang sudah diremajakan kembali dalam Mueller Hinton Agar (MHA) masing-masingnya dituang ke dalam 20 ml media Nutrient Agar (NA) yang masih cair, suhu berkisar antara 40°C, kemudian baru dituang ke dalam cawan petri steril hingga agar mengeras; Diletakkan kertas cakram steril dengan pinset diatas NA tersebut kemudian

diteteskan 20 µl supernatan BAL dengan pipet mikro, lalu diletakkan juga antibiotic testing paper yaitu Penicillin sebagai pembanding, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C secara anaerob; Dilakukan pengamatan terhadap zona hambat dengan cara mengukur zona bening yang berbentuk lingkaran pada jam ke-24 dengan menggunakan mistar.

## **8. Analisa Proximat**

### **a. Kadar Air**

Analisis kadar air *budu*, yang pertama adalah cawan aluminium dikeringkan dengan oven pada suhu 110 °C selama 1 jam dan didinginkan dalam desikator. Setelah itu cawan ditimbang dan diisi sampel sebanyak 5 gram. Kemudian dikeringkan di dalam oven pada temperature 105°C selama 8 jam. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang selanjutnya dilakukan secara berulang-ulang sampai beratnya menjadi konstan. Rumus dari kadar air adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{berat Sampel} - \text{Berat Akhir Sampel}}{\text{Berat Sampel Awal}} \times 100\%$$

### **b. Kadar Protein**

Kadar protein *budu* ditentukan berdasarkan pedoman Sudarmadji *et al.*, (1996) dengan metode Kjeldahl. Prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

#### **1. Tahap Destruksi**

Sampel ditimbang sebanyak 1 gram *budu* kering dimasukkan ke dalam labu kjeldahl. Kemudian ditambahkan katalisator selenium sebanyak 1 gram serta 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat lalu dipanaskan sehingga terjadi destruksi. Pemanasan dilakukan terus sehingga larutan jernih atau tidak bewarna kemudian didinginkan.

#### **2. Tahap Destilasi**

Larutan di pindahkan ke dalam labu ukur 500 ml lalu diencerkan dengan aquadest sampai tanda garis. Di ambil 25 ml larutan sampel ditambah 25 ml NaOH 30% yang telah dicampur dengan aquadest sebanyak 150 ml dan dimasukkan ke dalam labu destilasi. larutan (2/3 tersuling) dipanaskan, hingga semua N dari cairan yang ada dalam labu tertangkap oleh H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N yang terlebih dahulu telah dicampur dengan tetes indikator metil merah dan erlemeyer.

### 3. Tahap Titrasi

Erlenmeyer yang berisi hasil sulingan dititer dengan NaOH 0,01N (Z ml). Dalam Erlenmeyer lain ditambahkan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 N dan 3 tetes indikator methyl merah dan dititer dengan NaOH 0.1 sehingga terjadi perubahan warna dari merah jambu menjadi kuning sebagai blangko (Y ml).

Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(Y - Z) \times N_{\text{NaOH}} \times 0,014 \times 6,38}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Y = Volume pentiter blangko (ml)

Z = Volume pentiter sampel (ml)

N = Normalitas NaOH

6,38 = Faktor konversi dari total N ke dalam protein

#### c. Kadar Lemak

Untuk menghitung kadar lemak *budu* dengan metode soxhlet berdasarkan pedoman Sudarmadji dkk, (1989). Sampel yang sudah dikeringkan dibungkus sebanyak 1 gram dengan kertas lemak lalu keringkan dengan oven listrik selama 12 jam pada suhu 105°C. Setelah itu, bungkusan panas-panas ditimbang kemudian dilakukan ekstraksi dengan benzene selama 4-6 jam sampai benzene dalam soxhlet menjadi jernih. Ekstraksi selesai, sambil sampel didinginkan hingga kering, dimana benzene akan menguap. Sampel dikeringkan dalam oven listrik dengan suhu 105°C selama 4 jam untuk mendapatkan berat yang konstan. Setelah itu bungkusan ditimbang tu persatu dalam keadaan panas. Selisih berat sebelum dan sesudah diekstraksi merupakan berat lemak yang ada dalam bahan pangan tersebut, penghitungan kadar lemak gunakan rumus sebagai berikut:

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

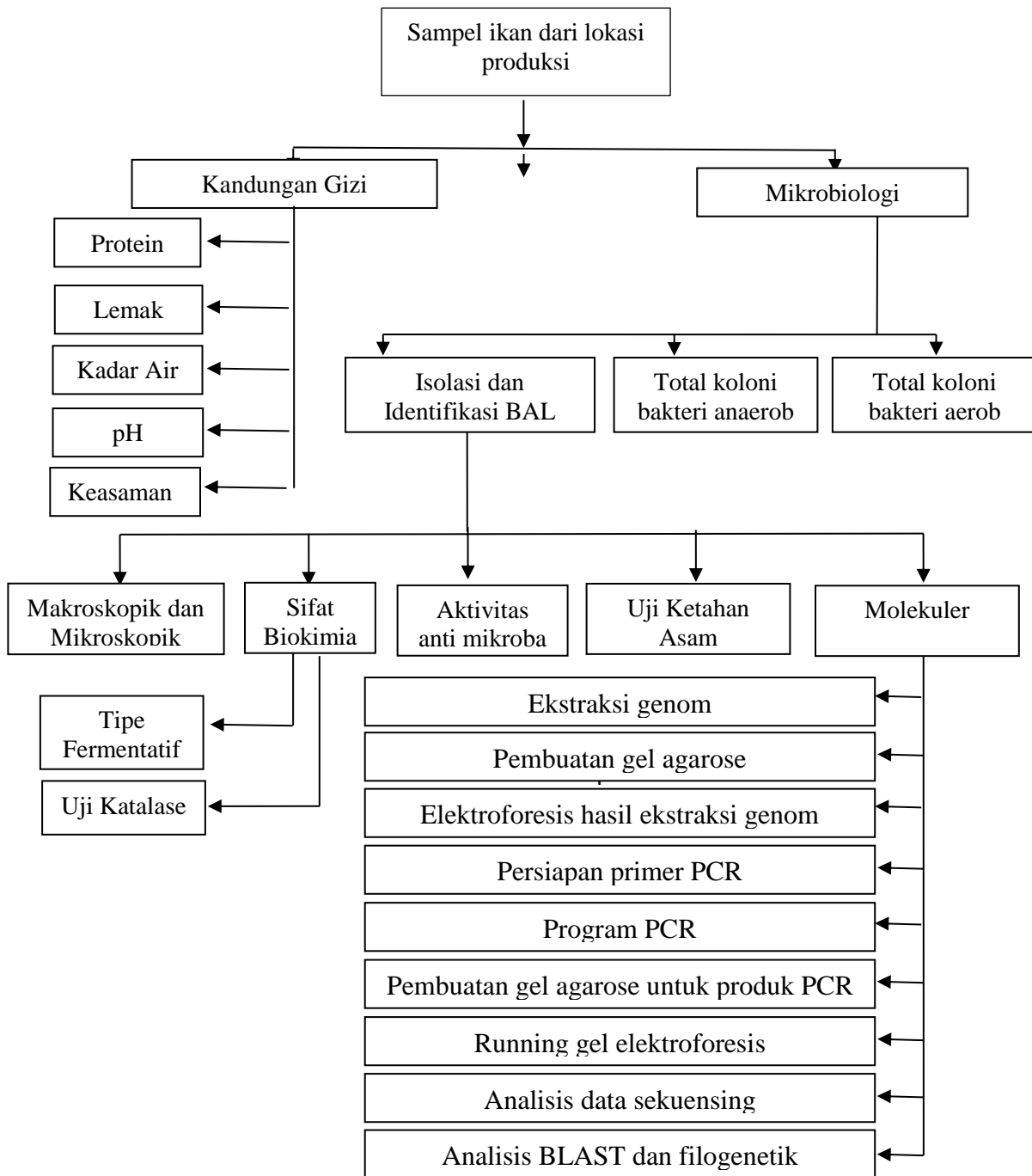
#### Keterangan

- a = berat awal (berat kertas saring+ berat sampel)
- b = berat akhir (berat kertas saring + berat ekstrak lemak)
- c = berat sampel

#### **d. pH**

Pengukuran pH *budu* menggunakan alat pH meter. Langkah pertama adalah menyalakan dan menstabilkan pH meter selama 15-30 menit. Selanjutnya dilakukan standarisasi dengan larutan buffer pada pH 4 dan 7. Elektroda dibilas akuades dan dikeringkan, selanjutnya dicelupkan pada sampel. pH meter dibiarkan hingga menunjukkan suatu angka yang stabil pada suhu tertentu.

## SKEMA PROSEDUR PENELITIAN





**Tabel 1. Luaran Capaian Kemajuan**

No	Jenis Luaran	Indikator Capaian			
		TS <sup>1)</sup>	TS+1	TS+2	
1.	Publikasi ilmiah <sup>2)</sup>	Internasional	draft	submitted	accepted
2.	Pemakalah dalam pertemuan Ilmiah <sup>3)</sup>	Internasional	draft	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Nasional	draft	belum/tidak ada	draft
3.	Keynote speaker dalam pertemuan ilmiah <sup>4)</sup>	Internasional	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Nasional	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
4.	Visiting Lecturer <sup>5)</sup>	Internasional	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
5.	Hak Atas Kekayaan Intelektual (HKI) <sup>6)</sup>	Paten	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Paten sederhana	belum/tidak ada	draft	terdaftar
		Hak Cipta	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Merek dagang	belum/tidak ada	draft	Belum terdaftar
		Rahasia dagang	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Desain Produk Industri	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Indikasi Geografis	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
		Perlindungan Varietas Tanaman	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
	Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu	belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada	
6.	Teknologi Tepat Guna <sup>7)</sup>		belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
7.	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>8)</sup>		belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
8.	Buku Ajar (ISBN) <sup>9)</sup>		belum/tidak ada	belum/tidak ada	belum/tidak ada
9.	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>10)</sup>		3	4	5

<sup>1)</sup> TS = Tahun sekarang (tahun pertama penelitian)

<sup>2)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, submitted, reviewed, atau accepted/published

<sup>3)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

<sup>4)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

<sup>5)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

<sup>6)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, atau terdaftar/granted

<sup>7)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, produk, atau penerapan

<sup>8)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, produk, atau penerapan

<sup>9)</sup> Isi dengan belum/tidak ada, draf, proses editing/sudah terbit

<sup>10)</sup> Isi dengan skala 1-9 dengan mengacu pada Bab 2

## BAB. 4 HASIL PENELITIAN

### 1. Analisa Proximat

Kualitas gizi ikan fermentasi yang digunakan *budu*, *boyom* dan *pado* dapat dilihat pada tabel 2, berikut.

Tabel 2. Kualitas Gizi Ikan Fermetasi (*budu*, *boyom* dan *pado*)

<b>Kode Sampel</b>	<b>Kadar Air (%)</b>	<b>Kadar Protein (%)</b>	<b>Kadar Lemak (%)</b>	<b>pH</b>
PR1	38,88	34,64	3,74	6,3
AG	53,38	21,66	15,54	4,9
UP	62,77	25,95	10,12	5,3
BA	56,44	27,11	8,62	4,8
ZA	60,49	20,98	7,83	4,3

Kandungan protein ikan *pado* hasil penelitian meningkat dibandingkan ikan segar, dimana ikan segar yang telah diuji sebelumnya memiliki kandungan protein 16,30%. Hasil penelitian pada ikan *pado* meningkat dibandingkan ikan segar, dimana ikan *tamban* segar yang telah di uji memiliki kadar lemak 5,71%. Kadar air ikan *pado* selama fermentasi menurun dibandingkan ikan segar, kandungan air ikan *tamban* segar yang digunakan sebagai bahan dasar *pado* adalah 74,53%. Nilai pH yang terkandung pada ikan *pado* hasil penelitian tergolong rendah, lebih rendah dibandingkan penelitian Thariq *et al.* (2014) tentang ikan peda dengan konsentrasi garam yang berbeda yaitu 6,01, 6,06 dan 6,17.

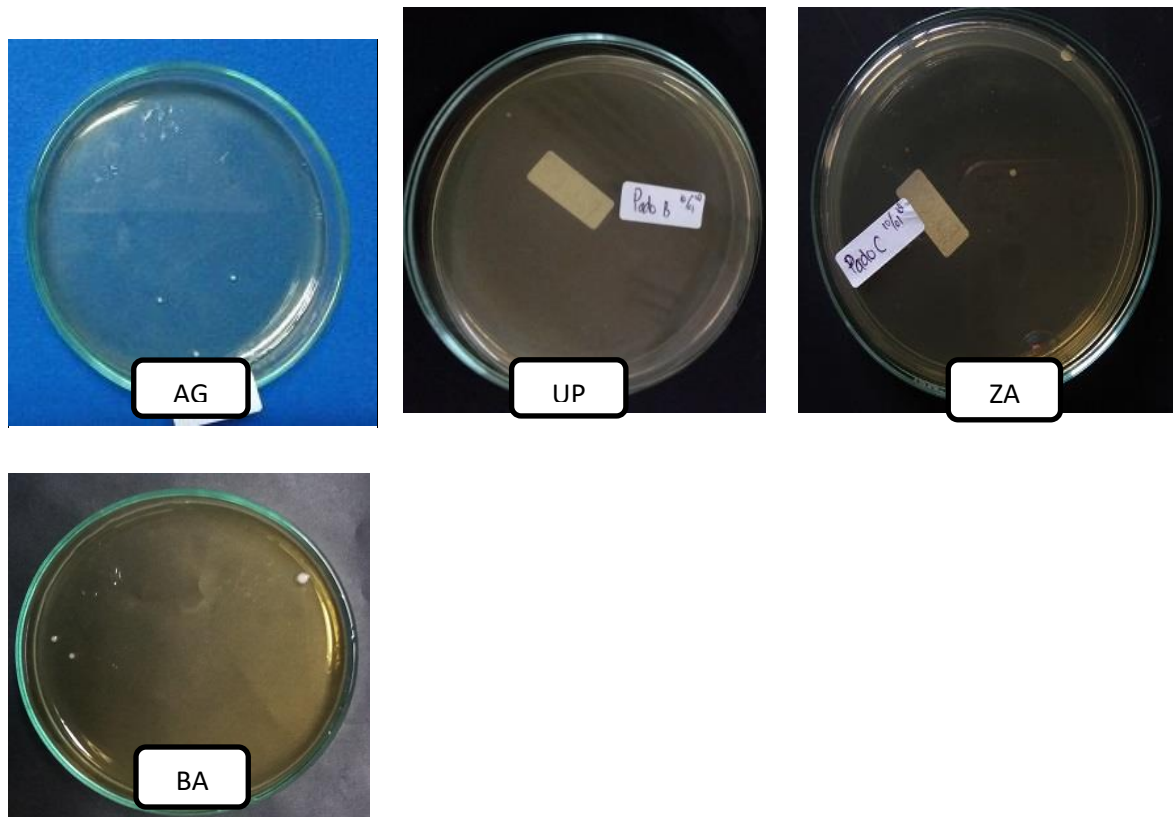
### 2. Total Koloni BAL

Penghitungan total koloni BAL dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui banyaknya jumlah koloni BAL yang terdapat dalam sampel yang digunakan. Hasil dari total koloni BAL ikan fermentasi bisa dilihat lebih jelas pada Tabel 3.

Tabel 3. Total Koloni Bakteri Asam Laktat

Kode Sampel	Total Koloni BAL (10 <sup>6</sup> CFU/g)
PR1	36
AG	3
UP	1
BA	2
ZA	3

Hal ini sesuai dengan kriteria FAO/WHO (2002) karena sebagai pangan probiotik BAL yang dihasilkan harus berada pada jumlah 10<sup>6</sup> – 10<sup>8</sup> CFU/gram. Total koloni bakteri asam laktat diplating ke Media MRS agar, dan Inkubasi an-aerob selama 24 jam suhu 37 °C. didapat dengan total tertinggi pada sampel PR 1 yakni budu dari padang pariaman.



Gambar 2. Total Koloni BAL pada dan budu Asal Padang Pariaman

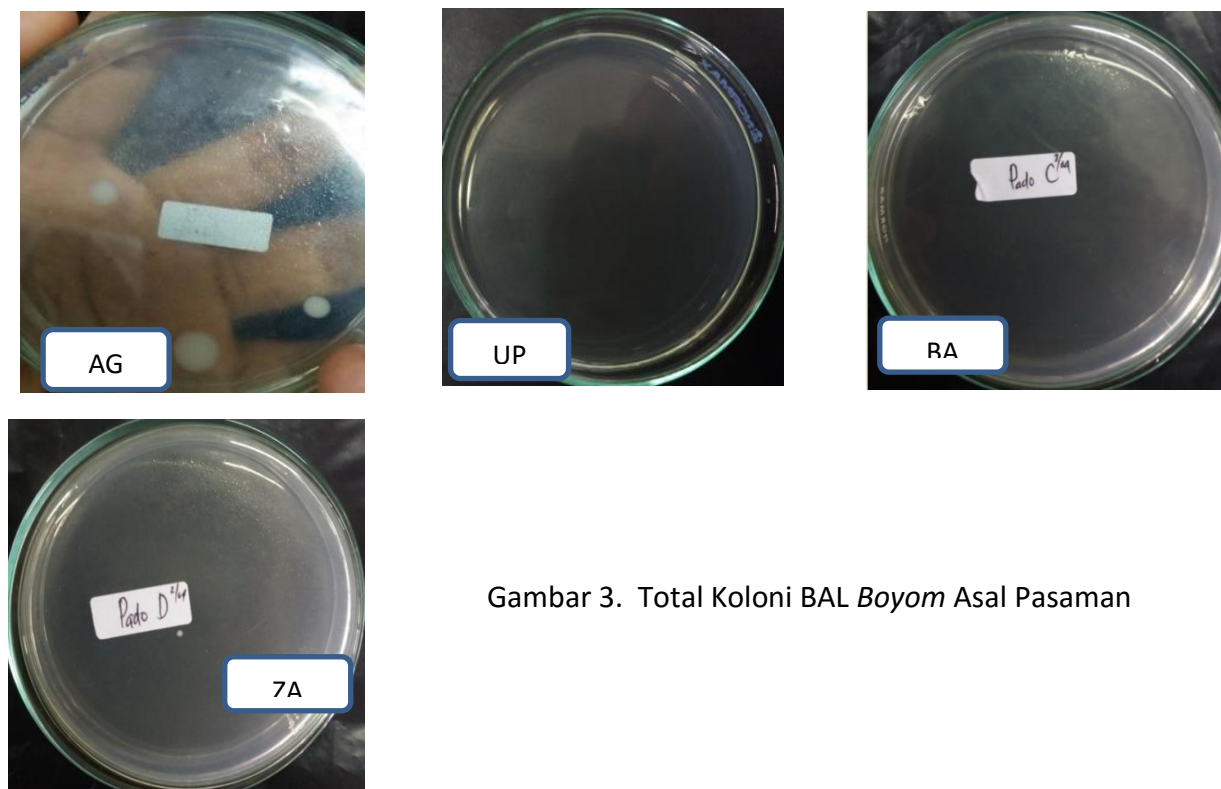
### 3. Total Bakteri Aerob

Total koloni bakteri aerob atau sering disebut *Total Plate Count* (TPC) dihitung dengan rumus CFU/g, setelah ditumbuhkan bakteri aerob pada PCA, dilakukan penghitungan total koloni, sehingga didapatkan total koloni bakteri aerob pada tabel 4 berikut.

Tabel 4. Total Koloni bakteri Aerob

Kode Sampel	Total Koloni Aerob (10 <sup>4</sup> CFU/g)
PR1	25
AG	3
UP	-
BA	-
ZA	4

Hasil rentang jumlah total koloni bakteri aerob dalam peneliiian ini yaitu 0-25 x 10<sup>4</sup> CFU/g. Hasil yang didapatkan sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (2009) tentang cemaran mikroba pada ikan yaitu maksimal sebanyak 5 x 10<sup>5</sup> CFU/g. pendapat Afrianto dan Liviawaty (2010) menyatakan bahwa banyak bakteri yang tidak dapat beradaptasi dengan baik pada suasana asam sehingga tidak terjadi pertumbuhan bakteri dan berdampak pada terhambatnya pertumbuhan sejumlah koloni TPC selama penyimpanan.



Gambar 3. Total Koloni BAL *Boyam* Asal Pasaman

#### 4. Identifikasi dan Morfologi Isolat BAL

Isolasi dan Identifikasi BAL secara makroskopis dimulai dengan menumbuhkan BAL pada medium selektif *MRS broth* yang mengandung nutrisi-nutrisi dan pH optimum untuk pertumbuhan BAL. BAL yang telah dilakukan pengayaan dengan *MRS Broth* selama 24 jam dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat sampai dengan 10<sup>-6</sup>. Hasil pengenceran ditanam ke dalam *MRS agar* dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi akan muncul koloni-koloni BAL dengan warna putih kekuningan pada media yang digunakan. Setelah BAL hasil isolasi dan identifikasi ditumbuhkan, kemudian dilakukan pengamatan BAL secara makroskopis.

Ciri-ciri koloni BAL hasil identifikasi yang akan diseleksi adalah berbentuk bulat, licin dan bewarna krem. Hasil pengamatan isolat BAL secara makroskopis terlihat pada Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Identifikasi Morfologi BAL secara Makroskopis

Isolat	Identifikasi Makroskopis			
	Warna	Bentuk Koloni	Ukuran Koloni	Permukaan
PR1	Putih-Krem	Bulat		Licin, Cembung
AG	Putih-Krem	Bulat		Licin, Cembung
UP	Putih-Krem	Bulat		Licin, Cembung
BA	Putih-Krem	Bulat		Licin, Cembung
ZA	Putih-Krem	Bulat		Licin, Cembung

Pengamatan secara makroskopis (bentuk, ukuran dan warna) BAL ditemukan koloni bewarna putih krem, berbentuk bulat dan memiliki elevasi cembung dengan tepian licin pada media *MRS Agar MERCK*. Hal ini sesuai dengan penelitian Purwati *et al.* (2005) bahwa koloni BAL pada media *MRS Agar* bewarna putih krem. Setelah pengamatan secara makroskopis, dilakukan pemurnian koloni dengan menumbuhkan koloni terpilih ke dalam media baru dengan metode *streak*. Pemurnian koloni ini digunakan sebagai stok bakteri yang akan digunakan untuk uji selanjutnya, yaitu identifikasi mikroskopis dan molekuler.

Willey *et al.* (2008) menyatakan berdasarkan respon terhadap pewarnaan gram, bakteri dibedakan menjadi dua macam yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Perbedaan dari kedua bakteri ini adalah dari struktur dinding selnya. Dinding sel bakteri gram positif terdiri dari

lapisan peptidoglikan homogen dengan ketebalan sekitar 20 - 80 nm yang terletak di luar lapisan membran plasma. Sementara dinding sel bakteri gram negatif ketebalan lapisan peptidoglikannya antara 2 - 7 nm dan dilapisi oleh membran luar dengan ketebalan 7 - 8 nm. Dengan begini bakteri gram positif karena memiliki peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Hal ini menjadikan bakteri ini akan terlihat berwarna ungu dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang akan menghasilkan warna pink jika dilakukan pewarnaan gram.

## 5. Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan untuk mengetahui apakah isolat BAL mempunyaikemampuan untuk menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Uji katalase dilakukan dengan cara menggoreskan isolat BAL menggunakan jarum ose kepada gelas objek yang berisi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% sebanyak 50 $\mu$ l, selanjutnya dilakukan pengadukan dan diamati apakah terbentuk gelembung udara atau tidak. Pada penelitian yang dilakukan terhadap BAL asal ikan *pado*, tidak terdapat gelembung udara yang ditemukan. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji katalase

<b>Kode Sampel</b>	<b>Katalase</b>
PR1	Negatif (-)
AG	Negatif (-)
UP	Negatif (-)
BA	Negatif (-)
ZA	Negatif (-)

Tidak adanya gelembung pada gelas objek menandakan bahwasanya BAL yang didapat dari ikan fermentatif merupakan katalase negatif. 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. Bakteri Asam Laktat termasuk bakteri katalase negatif, sehingga tidak

menghasilkan gelembung gas. Hal ini sejalan dengan penelitian Desniar *et al.* (2009) yang menemukan uji katalase negatif dari BAL asal produk ikan fermentasi bekasam.

## 6. Uji Tipe Fermentasi

Uji tipe fermentasi dilakukan untuk mengetahui apakah isolat BAL yang didapat merupakan bakteri homofermentatif atau heterofermentatif dengan menggunakan tabung durham. Isolat BAL yang didapat dimasukkan ke dalam MRS *broth* dan di inkubasi selama 48 jam, selanjutnya amati apakah terdapat gelembung gas atau tidak pada tabung durham. Pada penelitian BAL yang diisolat dari ikan *pado* asal Padang Pariaman tidak ditemukan satupun gelembung gas pada tabung durham, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Tipe Fermentatif BAL

<b>Kode Sampel</b>	<b>Tipe Fermentatif</b>
PR1	Homofermentatif
AG	Homofermentatif
UP	Homofermentatif
BA	Homofermentatif
ZA	Homofermentatif

Bakteri asam laktat heterofermentatif, penguraian glukosa oleh BAL terjadi melalui jalur pentose fosfat. Pada fermentasi ini yang bekerja adalah enzim fosfoketolase dan dapat menghasilkan asam laktat 40-50 %, etanol, asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan elektron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus *Lactobacillus* terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub grup, kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya (Syukur dan Purwati, 2013)

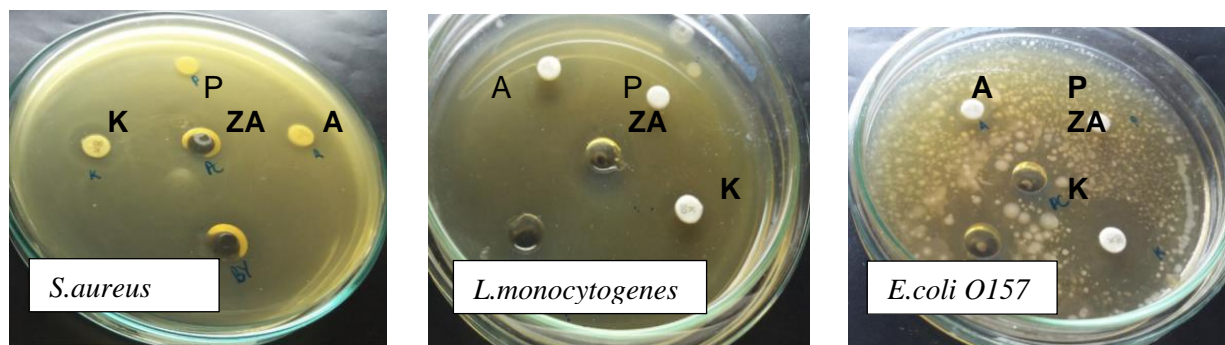
## 7. Skrining BAL Potensial Antibakteri

Aktivitas antimikroba dilakukan untuk mengetahui daya hambat BAL terhadap bakteri patogen. Pengujian antimikroba dan antibiotik dilakukan pada satu sampel dengan kode PR 1, BYA dan ZA Tabel 8 di bawah merupakan hasil yang didapatkan dari pengujian aktivitas antimikroba.

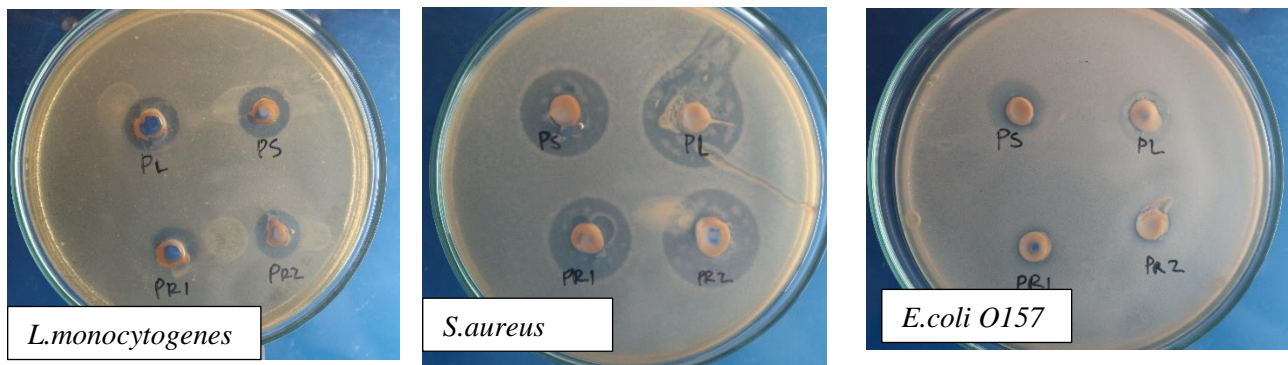
Tabel 8. Aktifitas Antibakteri BAL terhadap bakteri Patogen

Isolat	Bakteri Uji (mm)		
	<i>Eschericia coli</i> O157	<i>Staphylococcus aereus</i>	<i>Lysteria Monocytogenes</i>
PR1	10	18	10
ZA	18	18	18

Bakteri patogen yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Eschericia coli* O157. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode sumur dan kemampuan dari aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media *nutrient* agar yang telah diinfeksi dengan bakteri uji. Seeley, Vandemark dan Lee (2004) menyatakan produksi asam laktat akan menyebabkan terbentuknya zona bening di sekitar koloni BAL. 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 asal ikan fermentasi yang memiliki zona bening maksimal 18 mm masuk kategori kuat terhadap ketiga bakteri uji.



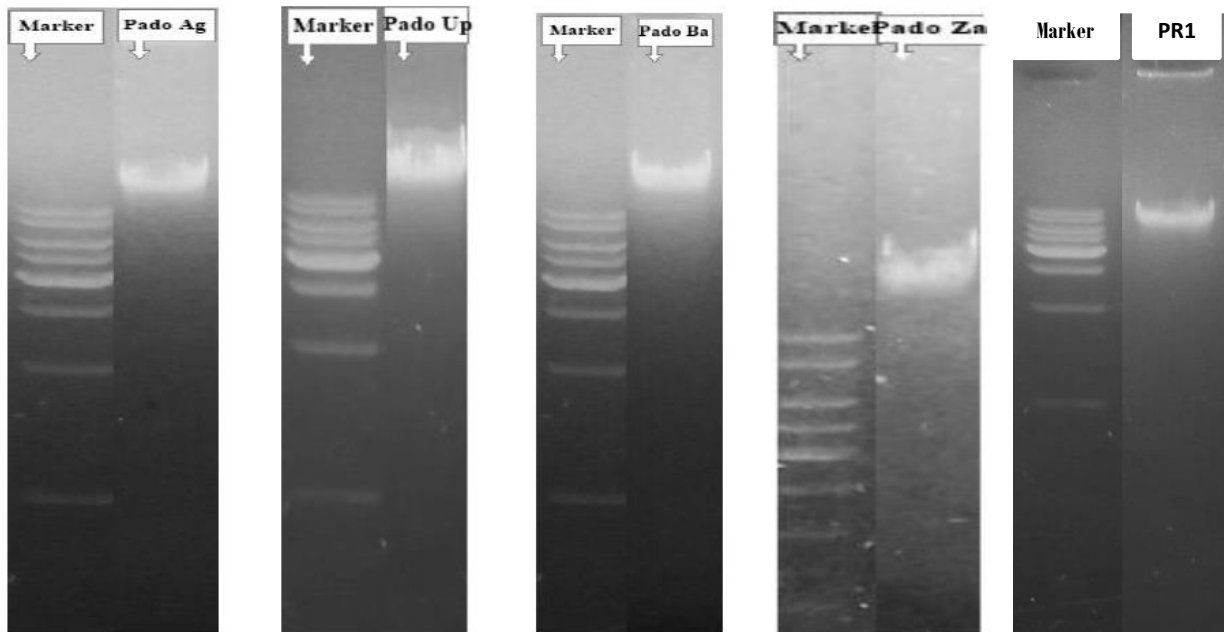




Gambar 4. Aktivitas antimikroba isolat BAL ikan *pado* ZA dan antibiotik terhadap bakteri uji. P adalah penisilin, A adalah ampisilin, K adalah kanamisin dan ZA adalah isolat BAL ikan *pado* ZA. Dan Isolat PR1 dari ikan budu.

## 8. Ekstraksi Genom BAL

Hasil elektroforesis dari ekstraksi genom menunjukkan bahwa berat molekul DNA template berada di atas 3000 bp. Hasil ekstraksi genom tidak dapat dipastikan angka mutlakannya, namun hanya membandingkan dengan marker yang digunakan. Marker yang paling di atas menunjukkan angka 3 000 bp. Hal serupa disampaikan oleh Hartati, Gaffar dan Maksum (2012) pada laporan penelitiannya yang menyampaikan bahwa hasil isolasi DNA genom yang terlihat pada sinar UV menandakan bahwa seluruh tahap isolasi DNA genom berlangsung dengan baik karena memperlihatkan adanya satu pita DNA yang berada jauh diatas pita pertama penanda DNA pUC19/Hinf I pada gel agaros.



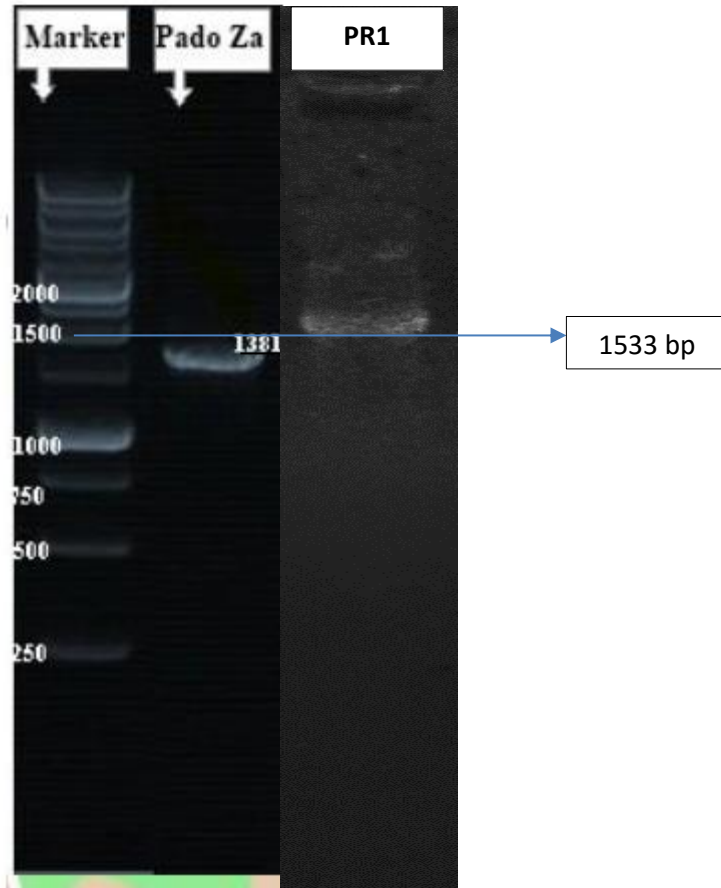
Gambar 5. Ekstraksi Genom d Ekstraksi genom isolat BAL ikan *pado* dan budu Padang Pariaman  
Keterangan : Kode AG, UP, BA, ZA, dan PR1

Gambar di atas menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri asam laktat asal ikan *pado* berhasil dilakukan ekstraksi genom, hal ini ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang lebih tinggi dibandingkan marker setelah dilakukan pengamatan di bawah sinar UV.

## 9. PCR BAL

Amplifikasi gen 16S rDNA terhadap DNA genom bakteri asam laktat dilakukan untuk memastikan keberhasilan proses isolasi DNA genom. Selain itu produk PCR gen 16S rRNA juga digunakan untuk identifikasi bakteri asam laktat yang telah berhasil di isolasi. Baker, Gaffar, Cowon dan Suharto (2001) menyatakan bahwa gen 16S rDNA merupakan gen pengkode rRNA 16S pada bakteri. Gen ini mempunyai beberapa urutan yang conserved (lestari) dan beberapa urutan yang bervariasi pada eubakteria, sehingga urutan nukleotida gen 16S rDNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Syukur dan Purwati (2013) menyatakan bahwa untuk mengetahui berhasil tidaknya reaksi PCR, maka metode yang sering dipakai adalah elektroforesis dengan prinsip dasarnya adalah pemisahan molekul protein berdasarkan ukuran berat molekul dengan menggunakan arus listrik. Dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan *gelview* dan hasil elektroforesis dapat diamati dengan

menggunakan sinar ultraviolet seperti gambar dibawah ini.



Gambar 6. Hasil Elektroforesis Isolat ZA dan PR1 dengan PCR

## 10. Analisis sekuensing dan pohon Filogenetik

Hasil sekuensing dibandingkan dengan data *Gene Bank* menggunakan program BLAST yang dilakukan online pada website NCBI. Data sekuensing, hasil analisis BLAST serta, Tabel 9 di bawah ini.

Tabel 9. Data Sekuensing ZA

```
CACCGACTTT GGGTGTACAA AACTCTCATG GTGTGACGGG CGGTGTGTAC AAGGCCCGGG
AACGTATTCA CCGCGGCATG CTGATCCGCG ATTACTAGCG ATTCGCGACTT CGTGCAGGCG
AGTTGCAGCC TGCAGTCCGA ACTGAGAACG GTTTTAAGAG ATTTGCTTGC CCTCGCGAGT
TCGCGACTCG TTGTACCGTC CATTGTAGCA CGTGTGTAGC CCAGGTCATA AGGGGCATGA
TGATCTGACG TCGTCCCCAC CTTCTCCGG TTTGTACCCG GCAGTCTCAC TAGAGTGCCC
AACTTAATGC TGGCAACTAG TAACAAGGGT TGCCTCGTTC GCGGGACTTA ACCCAACATC
TCACGACACG AGCTGACGAC GACCATGCAC CACCTGTTCAT TGCCTTCCCG AAGGAAACGC
CCTATCTCTA GGGTTGGCGC AAGATGTCAA GACCTGGTAA GGTTCTTCGC GTAGCTTCGA
ATTAAACCAC ATGCTCCACC GCTTGTGCGG GCCCCCCGTC AATTCCTTTG AGTTTCAACC
TTGCGGTCGT ACTCCCCCAG GCGGAGTGCT TAATGCGTTA GCTCCGGCAC TGAAGGGCGG
AAACCCTCCC AACACCTAGC ACTCATCGTT TACGGCATGG ACTACCAGG TATCTAATCC
TGTTTCGCTAC CCATGCTTTC GAGTCTCAGC GTCAGTTGCA GACCAGGTAG CCGCCTTCGC
CACTGGTGTG CTTCCATATA TCTACGCATT CCACCGCTAC ACATGGAGTT CCACTACCCT
CTTCTGCACT CAAGTTATCC AGTTTCCGAT GCACTTCTCC GGTTAAGCCG AAGGCTTTCA
CATCAGACTT AGAAAACCGC CTGCACTCTC TTTACGCCCA ATAAATCCGG ATAACGCTTG
CCACCTACGT ATTACCGCGG CTGCTGGCAC GTAGTTAGCC GTGACTTTCT GGTTAAATAC
CGTCAACGTA TGAACAGTTA CTCTCATAAG TGTTCTTCTT TAACAACAGA GCTTTACGAG
CCGAAACCCT TCTTCACTCA CGCGGTGTTG CTCCATCAGG CTTGCGCCCA TTGTGGAAGA
TTCCCTACTG CTGCCTCCCG TAGGAGTATG GGCCGTGTCT CAGTCCCATT GTGGCCGATC
AGTCTCTCAA CTCGGCTATG CATCATCGCC TTGGTAGGCC GTTACCCAC CAACAAGCTA
ATGCACCGCA GGTCCATCCA GAAGTGATAG CGAGAAGCCA TCTTTTAAGC GTTGTTCATG
CGAACAACGT TGTTATGCGG TATTAGCATC TGTTTCCAAA TGTTGTCCCC CGCTTCTGGG
CAGGTTACCT ACGTGTTACT CACCCGTCCG CCACTCGTTG GCGACCAAAA TCAATCAGGT
GCAAGCACCA TCAATC
```

Tabel 10. Data Sekuensing PR1

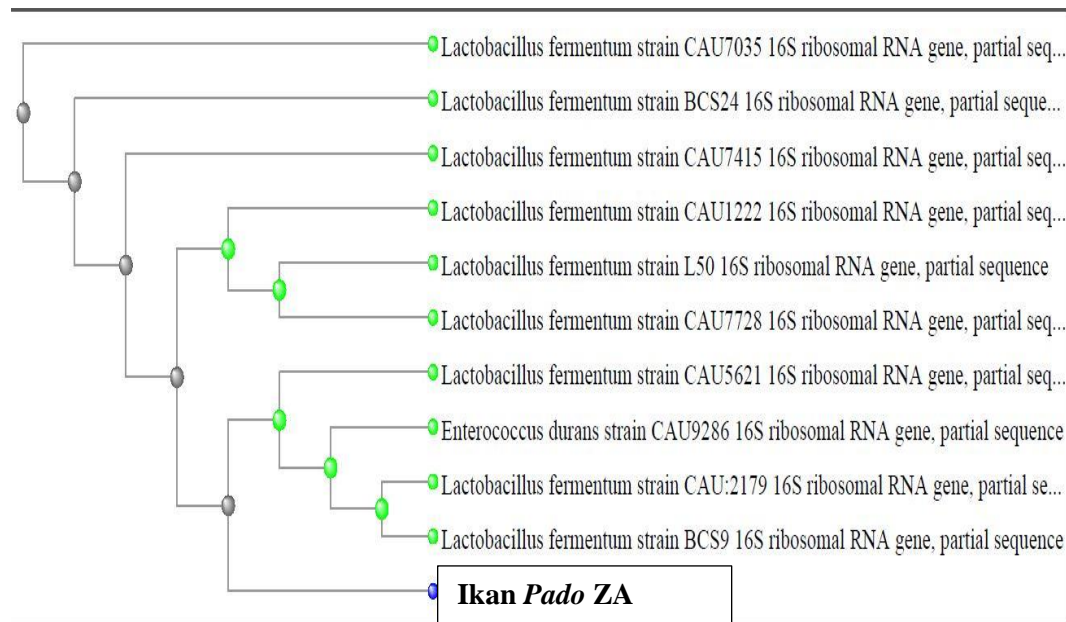
GCTCGCTCCT	AAAGGGTTAC	GCCACCGGCT	TCGGGTGTTA	CAAACCTCTCA	TGGTGTGACG
GGCGGTGTGT	ACAAGGCCCG	GGAACGTATT	CACCGCGGCG	TGCTGATCCG	CGATTACTAG
CGATTCCGAC	TTCGTGTAGG	CGAGTTGCAG	CCTACAGTCC	GAACCTGAGAA	TGGCTTTAAG
AGATTAGCTT	GACCTCGCGG	TCTCGCAACT	CGTTGTACCA	TCCATTGTAG	CACGTGTGTA
GCCCAGGTCA	TAAGGGGCAT	GATGATTTGA	CGTCATCCCC	ACCTTCCTCC	GGTTTGTAC
CGGCAGTCTT	ACTAGAGTGC	CCAATAAAT	GCTGGCAACT	AGTCATAAAG	GTTGCGCTCG
TTGCGGGACT	TAACCCAACA	TCTCACGACA	CGAGCTGACG	ACAACCATGC	ACCACCTGTC
ATTTTGCCCC	CGAAGGGGAA	ACCTGATCTC	TCAGGTGATC	AAAAGATGTC	AAGACCTGGT
AAGGTTCTTC	GCGTTGCTTC	GAATTA AAC	ACATGCTCCA	CCGCTTGTGC	GGGCCCCCGT
CAATTCCTTT	GAGTTTCAAC	CTTGCGGTCG	TACTCCCCAG	GCGGAATGCT	TAATGCGTTA
GCTGCGGCAC	TGAAGGGCGG	AAACCTCCA	ACACCTAGCA	TTCATCGTTT	ACGGCATGGA
CTACCAGGGT	ATCTAATCCT	GTTTCGCTACC	CATGCTTTTCG	AGCCTCAGCG	TCAGTTACAG
ACCAGACAGC	CGCCTTCGCC	ACTGGTGTTT	TTCCATATAT	CTACGCATTT	CACCGCTACA
CATGGAGTTC	CACTGTCTC	TTCTGCACTC	AAGTTTCCCA	GTTTCCGATG	CGCTTCCTCG
GTTAAGCCGA	GGGCTTTCAC	ATCAGACTTA	AAAAACCGCC	TGCGCTCGCT	TTACGCCCAA
TAAATCCGGA	TAACGCTTGC	CACCTACGTA	TTACCGCGGC	TGCTGGCACG	TAGTTAGCCG
TGGCTTTCTG	GTTGGATACC	GTCACGCCGA	CAACAGTTAC	TCTGCCGACC	ATTCTTCTCC
AACAACAGAG	TTTTACGACC	CGAAAGCCTT	CTTCACTCAC	GCGGCGTTGC	TTCCATCAGAC
TTGCGTCCAT	TGTGGAAGAT	TCCCTACTGC	TGCCTCCCGT	AGGAGTTTGG	GCCGTGTCTC
AGTCCCAATG	TGGCCGATCA	ACCTCTCAGT	TCGGCTACGT	ATCATCGCCT	TGGTGAGCCA
TTACCTCACC	AACTAGCTAA	TACGCCGCGG	GTCCATCCAA	AAGCGATAGC	TTACGCCATC
TTTCAGCCAA	GAACCATGCG	GTTCTTGGAT	CTATGCGGTA	TTAGCATCTG	TTTCCAAATG
TTATCCCCCA	CTTAAGGGCA	GGTTACCCAC	GTGTTACTCA	CCCGTCCGCC	ACTCGTTCCA
TGTTGAATCT	CGGTGCAAGC	ACCGATCATC	AA		

Tabel 11. Hasil analisis BLAST persamaan sekuen gen 16S rRNA isolat ikan *pado* ZA dengan Bakteri *Gene Bank*

No	Description	% Similarity	Acession Number
1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU7415 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF108603.1
2	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU1222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF582951.1
3	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU5621 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF582848.1
4	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU9286 ribosomal RNA gene, partial sequences	99	MF424782.1
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:2179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF.354685.1
6	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain L50 16S ribosomal RNA gene, partial sequences	99	KP317718.1
7	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain BCS24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	EF113963.1
8	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain BCS9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	EF113958.1
9	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU7728 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF108745.1
10	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU7035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	MF108470.1

Tabel 12. Hasil analisis BLAST persamaan sekuen gen 16S rRNA isolat ikan *pado* ZA dengan *Bakteri Gene Bank*

No	Description	% Similarity	Acession Number
1	<i>Lactobacillus brevis</i> gene for 16S rRNA partial sequence. Strain; NRC 0138	99	AB362619.1
2	<i>Lactobacillus brevis</i> strain SRCM101106. Complete genom	99	CP021674.1
3	<i>Lactobacillus brevis</i> strain SRCM101174. complete genome	99	CP021479.1
4	Strain NPS-QW-145, complete genom	99	CP015398.1
5	<i>Lactobacillus brevis</i> KB290 DNA, complete genome	99	AP012167.1
6	<i>Lactobacillus brevis</i> strain BDGP6 chromosome, complete genome	99	CP024635.1
7	<i>Lactobacillus brevis</i> strain 100D8, complete genome	99	CP015338.1
8	<i>Lactobacillus brevis</i> strain TMW 1.2113, complete genome	99	CP019750.1
9	<i>Lactobacillus brevis</i> strain TMW 1.2112, complete genome	99	CP016797.1
10	<i>Lactobacillus brevis</i> strain BSO 464 genome	99	CP005977.1



Gambar 22. Hasil CLUSTAL, pohon filogenetik isolat ikan *pado* ZA

Berdasarkan hasil analisis menggunakan BLAST seperti pada Tabel 12 diatas diperoleh jenis bakteri isolat ikan *pado* ZA dan PR1 dari budu memiliki kemiripan 99% dengan *Lactobacillus fermentum* strain CAU5621 dan *Lactobacillus brevis* NRC 0138. Pada hasil pengamatan pohon filogenetik isolat ZA terlihat dengan jarak *Distances* terdekat *Lactobacillus fermentum* strain CAU562, begitu juga dengan isolat PR1 yang memiliki jarak *distances* terdekat dengan bakteri *Lactobacillus brevis* NRC 0138. Hal ini menandakan bahwa jenis bakteri isolat BAL pada ikan *pado* ZA yang ditemukan adalah *Lactobacillus fermentum* strain CAU5621, sesuai dengan Hagstrom, Pinhassi dan Zweifel (2000) menyatakan bahwa isolat yang memiliki kemiripan sekuen 16S rRNA lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93%-97% dapat mewakili identitas bakteri pada tingkat genus namun berbeda spesies.

Berdasarkan analisis perwarnaan Gram, PCR dan BLAST didapatkan hasil seragam pada isolat yang diambil pada ikan *pado* ZA. Pada pewarnaan Gram terlihat bahwa semua isolat berbentuk batang (*bacil*) dan merupakan Gram positif. Hasil katalase dan tipe fermentasi juga menunjukkan hasil yang seragam yaitu katalase negatif dan homofermentatif. Hasil analisis isolat dengan PCR dan BLAST yang dilakukan menunjukkan kemiripan pada jenis BAL *Lactobacillus fermentum*. Syukur dan Purwati (2013) menyatakan bahwa bakteri golongan *Lactobacillus* termasuk kelompok bakteri asam laktat dan paling banyak digunakan sebagai agen probiotik karena produk akhir metabolisme asam laktat berasal dari fermentasi gula dan merupakan bakteri anaerob yang banyak terdapat pada makanan fermentasi seperti yogurt, keju, asinan, kimchi, dan *stock fish*. *Lactobacillus fermentum* mampu tumbuh baik pada kisaran pH 2-3 dan garam empedu

0,3%-1%. Selain itu, bakteri *L. fermentum* mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen diantaranya bakteri *E. coli*, *S. typhimurium* dan *S. aureus* (Permanasari, 2008).

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Wikandari, Suparmo, Marsono dan Rahayu (2012) mendapatkan hasil identifikasi bakteri asam laktat asal bekasam adalah *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* dan *Pediococcus pentosaceus*. Penelitian ini juga berbeda dengan penelitian Nurnaafi, Setyaningsih dan Desniar (2015) mendapatkan identifikasi bakteri asam laktat asal bekasam ikan nila adalah *Lactobacillus plantarum*. Spesies bakteri yang ditemukan berbeda-beda karena jenis dari ikan fermentasi juga berbeda baik itu dari ikan segar yang digunakan, bahan untuk fermentasi serta cara fermentasi yang juga berbeda sehingga bakteri yang ditemukan juga akan berasal dari jenis yang berbeda.



## REFERENSI

- Araya, M.; Morelli, L.; Reid, G.; Sanders, M.E.; Stanton, C.; Pineiro, M. . 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations: London, ON, Canada.
- Anindita, N. S. 2013. Identifikasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Potensi Probiotik Pensintesis Conjugated Linoleic Acid (CLA) [Tesis] Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Aritonang E, Roza, Rossi E, Purwati E dan Husmaini. 2017. Isolation and identification of lactic acid bacteria from okara and evaluation of their potential as candidate probiotics. *Pakistan Journal of Nutrition*. 16 (8): 618-628.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official methods of analytical of the association of official analytical chemist. Washington, DC: AOAC.
- Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237e248.
- De Prisco, A.; Mauriello, G. 2016. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends Food Sci. Technol.*, 48, 27–39.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292e303.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Kanmani, P., & Lim, S. T. 2013. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*, 141(2), 1041e1049.
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. 2012. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 277e282.
- Ogier, J.C.; Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol*, 126, 291–301.

- Purwati, E, S.N. Aritonang, S. Melia, I. Juliyarsi dan H. Purwanto. 2016. Manfaat probiotik Bakteri Asam Laktat Dadih Menunjang Kesehatan Masyarakat. Tangerang Banten. Lembaga Literasi Dayak.
- Purwati, E., S. Syukur dan Z. Hidayat. 2005. *Lactobacillus sp.* Isolasi dari Biovicophitomega sebagai probiotik. Didalam Proceeding Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Salminen, S, Atte, V.W and Arthur O, 2004. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel .
- Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P.; Brassart, D.; de Vos, W.M.; Fonden, R.; Saxelin, M.;Collins, K.; Mogensen, G.; 1998. Demonstration of safety of probiotics—A review. *Int. J. Food Microbiol.*,44, 93–106.
- Syukur, S. dan E. Purwati. 2013. Bioteknologi Probiotik Untuk Kesehatan Masyarakat. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Syukur, S., U.L Sari, P. Endang, Urnemi dan Jamsari. 2011. Screening and Invitro Antimicrobial, Protease Activities From Lactic Acid Bacteria Associated With Green Cacao Fermentation in West Sumatra, Indonesia, Proseding Seminar Internasional HKI, Pekanbaru, Juli 17-21
- Vinderola, C. G, Gueimonde, M, Delgado, T, Reinheimer J. A. and de los Reyes – Gavilan, C. G. 2000. Characteristics carbonated fermented milk and survival of probiotik bacteria. *Internasional Dairy Journal*, 10-213-220.
- Yang, E. Fan L. Jiang, Y. Doucette, C and Fillmore, S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yoghurts. *AMB Express*.
- Yusra, Azima, F., Novelina, & Periadnadi. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Budu of West Sumatera to food biopreservatives. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(7), 628–635. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.628.635>
- Yusra, Y., Azima, F., Novelina, N., & Periadnadi, P. (2014). ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROFLORA INDIGENOUS DALAM BUDU (Isolation and Identifi cation of Indigenous Microfl ora in Budu). *Jurnal Agritech*, 34(03), 316. <https://doi.org/10.22146/agritech.9460>