

MOLEKULER KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT ISOLATE DADIH AIR DINGIN KABUPATEN SOLOK SUMATERA BARAT

Endang Purwati¹, S. Syukur², Husmaini¹, Hendri Purwanto¹ dan
Reno Permatasari Pasaribu²

¹Laboratorium Teknologi Hasil Ternak/ Bioteknologi Fakultas
Peternakan Universitas Andalas, Padang,
Sumatera Barat, Indonesia.

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia
E-mail : purwati17@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini tentang isolasi, karakterisasi dan identifikasi DNA BAL dadih daerah Air Dingin telah dilakukan dengan hasil menunjukkan bahwa total koloni bakteri asam laktat yaitu 1.46×10^8 CFU/g. Kadar lemak dadih 3.5418% diukur dengan metoda sokletasi dan kadar protein dadih 4.565% diukur dengan metoda Kjeldahl. Dari hasil isolasi bakteri asam laktat didapatkan sebelas (11) isolat yaitu R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R11, R12, R14. Karakter koloni dari sebelas isolat ini berbentuk bundar, permukaan cembung, berwarna putih susu dan merupakan bakteri Gram positif dengan sebelas isolat berbentuk sel batang. Uji katalase dan uji oksidase menunjukkan bahwa semua isolat negatif katalase dan negatif oksidase. Metode yang digunakan adalah 16S rRNA dengan primer P. Forward (27F ; AGAGTTTGATCCTGGCTGAG), P. Reverse (1492R; GTTTACCTTACGACTT) memberikan hasil elektroforesis DNA BAL pada 11 Isolate berukuran 1500 kb dan dilanjutkan dengan

menggunakan BLAST dan CLUSTER memberi hasil *Lactobacillus plantarum*.

Kata Kunci : dadih, susu kerbau, bakteri asam laktat, *Lactobacillus plantarum*.

A. PENDAHULUAN

Fermentasi adalah suatu proses dekomposisi lambat senyawa organik oleh mikroorganisme atau senyawa nitrogen kompleks (enzim) dari tumbuhan ataupun hewan. Fermentasi dapat terjadi karena aktivitas mikroba pada substrat organik yang sesuai.¹

Salah satu makanan fermentasi Sumatera Barat yang berasal dari susu adalah dadih, yaitu susu kerbau segar yang dimasukkan kedalam tabung bambu dan di fermentasi selama 2-3 hari pada suhu kamar melalui bantuan bakteri asam laktat (BAL).² Dilihat dari komposisi kimia dan nilai gizi, dadih mengandung kadar air (84,35%), protein (5,93%), lemak (5,42%), karbohidrat (3,34%).²

BAL merupakan bakteri asam laktat yang diperoleh dari hasil fermentasi. BAL mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Efek bakterisidal dari asam laktat berkaitan dengan penurunan pH 3 sampai 4,5 sehingga pertumbuhan bakteri lain termasuk bakteri pembusuk akan terhambat.³ BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin.⁴ Bakteri asam laktat dapat membantu meningkatkan absorpsi mineral (termasuk kalsium). Penurunan absorpsi mineral terjadi akibat gerakan peristaltik usus yang semakin cepat.⁵

Bakteri asam laktat adalah salah satu produk makanan yang

berkhasiat terapeutik lebih dikenal dengan istilah makanan fungsional. Salah satu makanan fungsional adalah makanan yang mengandung probiotik yaitu mikroba hidup yang bila dikonsumsi akan menimbulkan efek terapeutik pada tubuh dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan.⁶

B. METODOLOGI PENELITIAN

Prosedur Penelitian

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Enrichment :1 g dadih + 9 mL *MRS Broth* (Pengenceran 1 : 10), Pengenceran 10^{-1} , dimasukkan dalam *anaerob jar*, diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37 °C. 100 μ L Pengenceran 10^{-1} + 900 μ L *MRS Broth* Pengenceran 10^{-2} – 10^{-7} . 100 μ L dari serial pengenceran 10^{-7} diinokulasikan pada media *MRS Agar* dengan metode *spread*, dimasukkan dalam *anaerobjar*, diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam dengan suhu 37 °C. *Single colony* yang mencirikan BAL (bulat licin berwarna putih kekuningan) dipindahkan ke media *MRS Agar* untuk pemurnian koloni dengan metode *streak* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C.

Identifikasi Morfologi BAL

Identifikasi morfologi BAL dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati bentuk, warna dan ukuran koloni BAL yang tumbuh pada medium *MRS agar*. Identifikasi mikroskopik yaitu bentuk sel, dan identifikasi fisiologis

dengan uji Gram. Uji Gram positif jika sel berwarna ungu dan negatif jika sel berwarna merah.

Isolasi Genomik DNA BAL

Isolasi Genomik DNA Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan cara, yaitu menginokulasikan kultur BAL ke dalam 10 mL MRS *Broth*, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm (4°C) 5 menit. Didapatkan pellet dan supernatan, pellet digunakan untuk isolasi genomik DNA dan supernatannya dibuang. Selanjutnya pellet dicuci dengan 500 µL Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA dan pH 8), lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000rpm selama 5 menit dan supernatannya di buang. Pellet ditambahkan 200 µL 1 x TE, ditambahkan 25% sukrosa, ditambahkan 30mg/mL *lysozyme* 10 µL dan inkubasi selama 1 jam dengan suhu 37 °C. Setelah itu ditambahkan 370 µL 1 x TE buffer (pH 8) dan 1mg/mL Proteinase K, ditambahkan 30µL SDS 20 %, diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Ditambah NaCl 5M dan 100 µL, dan 50 µL CTAB 10. Diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 65° C dan 60°C selama 20 menit(dibolak-balik). Setelah itu ditambahkan 750 µL CI, disentrifugasi dengan kecepatan 6000rpm selama 5 menit. diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Ditambah NaCl 5M dan 100 µL, dan 50 µL CTAB 10. Diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 65°C dan 60°C selama 20 menit(dibolak-balik). Setelah itu ditambahkan 750 µL CI, disentrifugasi dengan kecepatan 6000rpm selama 5 menit. Sebanyak 400 µL lapisan atas dipindahkan pada tabung eppendorf yang baru, kemudian ditambahkan 750 µL isopropanol, disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit dan

supernatannya di buang. Pellet DNA ditambahkan 500 μ L etanol 70%, disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit dan supernatannya dibuang. Pellet DNA ditambahkan 100 μ L 1 x TE buffer, ditambahkan 100 μ g/mL Rnase dan diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Ditambahkan 1 x TE buffer sampai volume 400 μ L. Kemudian didinginkan dalam freezer dengan suhu -20°C selama 20 menit. Kemudian ditambahkan 400 μ L phenol dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000rpm selama 5 menit. Dipindahkan larutan bagian atas ke tabung eppendorf yang baru, kemudian ditambahkan 400 μ L CI dan disentrifugasi dengan kecepatan 600rpm selama 5 menit. Dipindahkan larutan bagian atas ke tabung eppendorf yang baru, kemudian ditambahkan 40 μ L NaCl 5M dan 800 μ L etanol 99%. Didinginkan dalam freezer dengan suhu -20°C selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit dan supernatannya dibuang. Pellet dicuci dengan 500 μ L etanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit, dibuang semua etanol, dan keringkan DNA dengan suhu 37°C selama 10 menit. Pellet DNA ditambah dengan 50 μ L aquadest steril, kemudian pellet DNA didinginkan dalam freezer dengan suhu -20°C selama 20 menit. Selanjutnya dipersiapkan untuk DNA genomik.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dalam *Thermocycler Mupid-Exu* dengan menggunakan primer 27F ; AGAGTTTGATCCTGGCTGAG untuk arah forward dengan primer 1492R; GTTTACCTTACGACTT.

Analisis Data Sekuensing

Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *software* DNA star. Untuk analisa *sequen alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (*query*) dengan data pada *Gene Bank* dengan *database searches* NCBI *internet site* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Mustopa, 2009).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Total Koloni Bakteri Asam Laktat (BAL)

Pada penelitian ini, dihitung total koloni BAL dan total pada koloni bakteri yang ada pada dadih Alahan Panjang. Hal ini bertujuan untuk menghitung banyaknya koloni bakteri yang ada pada dadih Alahan Panjang. Setelah ditumbuhkan bakteri asam laktat pada MRS agar, dilakukan penghitungan total koloni, sehingga didapatkan total koloni BAL dadih daerah Air Dingin Kabupaten Solok adalah 1.46×10^8 . Hal ini sesuai dengan pernyataan FAO bahwa total koloni bakteri asam laktat pada umumnya sebanyak $10^6 - 10^8$.

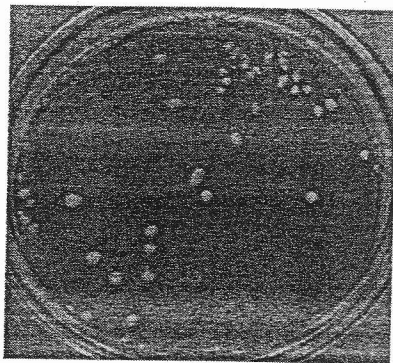
Pengukuran Kadar Protein dan Kadar Lemak Dadih

Pengukuran kadar protein, dilakukan sebanyak 3 kali. Pada ulangan pertama didapatkan kadar protein sebesar 5.0499%, ulangan kedua sebesar 4.66% dan ulangan ketiga sebesar 4.47%, sehingga didapatkan rata-rata kadar protein dadih daerah Air Dingin Kabupaten Solok sebesar 4.7266%. Sedangkan pada pengukuran kadar lemak dadih, juga dilakukan 3 kali pengulangan. Pada ulangan pertama didapatkan kadar lemak dadih sebesar 2.288%,

pada ulangan kedua sebesar 4.334% dan ulangan ketiga sebesar 3.997%, sehingga rata-rata kadar lemak dadih Air Dingin Kabupaten Solok yang didapatkan adalah sebesar 3.5418%.

Isolasi Bakteri Asam Laktat Dadih Air Dingin Kabupaten Solok

Isolasi BAL dari sampel dimulai dengan menumbuhkan BAL pada medium selektif MRS broth. MRS broth disebut sebagai medium pertumbuhan selektif karena mengandung nutrisi dan pH optimum pertumbuhan BAL. BAL yang telah dilakukan pengayaan dengan MRS Broth dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat sampai dengan 10^{-9} . Hasil pengenceran ditanam ke dalam MRS agar dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi akan muncul koloni-koloni BAL pada medium MRS agar yang berwarna putih kekuningan. Hasil isolasi BAL kemudian dimurnikan ke media agar yang baru sehingga didapatkan isolat yang murni. Dari hasil pemurnian, didapatkan 11 isolat BAL yaitu R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R11, R12, 14.



Gambar 1. Hasil isolasi BAL dengan pengenceran 10^{-9}

Identifikasi Morfologi BAL

Kegiatan identifikasi ini dilakukan pada 13 isolat BAL yang meliputi identifikasi secara makroskopik yaitu bentuk, warna, tepian, bentuk sel, uji gram, uji katalase dan uji oksidase. Berdasarkan identifikasi bentuk koloni BAL, penampakan ke-11 koloni BAL pada media MRS Agar berbentuk bundar, berwarna putih susu yang tidak merubah warna dari media MRS Agar (kuning kecoklatan), dengan tepian licin dan elevasi cembung. Koloni BAL pada media MRS Agar yang ditemukan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Komang dkk (2005) menyatakan bahwa karakterisasi morfologi isolat BAL berdasarkan warna menunjukkan bahwa koloni berwarna putih susu dengan bentuk bundar.[23] Tahap selanjutnya dilakukan uji Gram pada koloni tunggal (*single colony*) BAL. Isolat yang ada, didapatkan sebelas isolat berbentuk basil, itu merupakan bakteri gram positif yang berwarna ungu.

Isolasi DNA Genomik

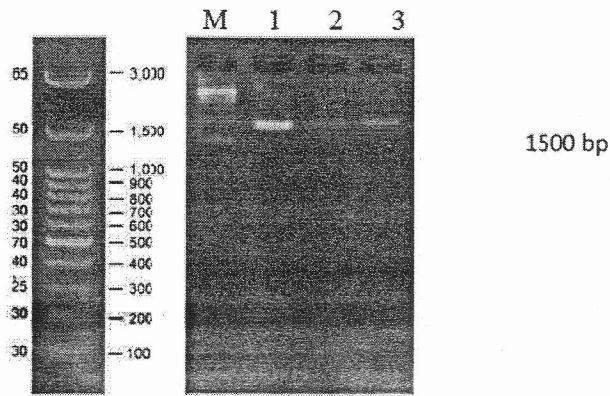
Prinsip dasar isolasi DNA adalah upaya untuk membebaskan materi-materi genetik dari dinding sel dan ikatan protein-protein histon yang terutama sekali terletak di dalam inti sel dengan mengupayakan tingkat kerusakan mekanis maupun fisik seminimal mungkin terhadap materi genetik tersebut.[24] Tahap pertama sentrifugasi untuk mendapatkan pellet sel yang terpisah dari media pertumbuhannya. Kemudian dilakukan pengrusakan dinding sel bakteri dengan penambahan SDS. SDS dapat melarutkan protein membran. EDTA mengikat ion Mg^{2+} sehingga mendestabilisasi membran (karena ion Mg ada pada protein membran hilang) dan menghambat DNase. Penggunaan pelarut organik akan

menggumpalkan DNA. Penambahan CI dilakukan dua kali karena protein mungkin masih tersisa pada tube dari pembersihan dengan CI pertama. Penambahan NaCl membuat konsentrasi garam tinggi dan single stranded RNA tidak bisa larut pada keadaan tersebut.

Etanol absolut dingin mengendapkan DNA dan untuk membilas dan mencuci DNA. DNA dipresipitasi oleh etanol. Penambahan garam berfungsi sebagai *neutralize charge* pada gula fosfat DNA. Ion-ion seperti kation (Na^+ Mg^{2+}) akan menyelimuti rantai DNA yang bermuatan negatif. Jika di dalam air, gaya elektrostatis antara ion $+$ (Na^+) dan $-$ (DNA) masih lemah karena sebagian rantai DNA masih berikatan dengan air atau dapat dikatakan air punya konstanta dielektrik yang tinggi. Fungsi penambahan pelarut organik seperti etanol untuk menurunkan konstanta dielektrik tersebut atau memperbanyak ikatan DNA dengan Na^+ sehingga membuat DNA lebih mudah terpresipitasi. Etanol 70% berfungsi untuk membersihkan lagi dan lebih memekatkan DNA.

Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR.

Hasil isolasi genomik DNA kemudian diamplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR sebanyak 40 siklus. Dielektroforesis selama 5 menit 100 volt dan 40 menit 80 Volt pada gel dengan konsentrasi 2%, sehingga total waktu yang dibutuhkan untuk melakukan elektroforesis adalah selama 45 menit.



Gambar 2. Visualisasi produk amplifikasi dengan PCR DNA isolat BAL terpilih.

Analisis BLAST Sekuen DNA

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia dari hasil yang didepositkan pada database gen bank sekuen publik. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website (NCBI, 2013: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)). Hasil analisis BLAST dari isolat adalah bakteri *Lactobacillus plantarum*.

D. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: Total koloni yang didapatkan dari isolasi dadih Air Dingin adalah 1.46×10^8 CFU/g, setelah dilakukan isolasi didapatkan sebelas isolat yang merupakan bakteri Gram positif dengan sebelas isolat berbentuk batang yakni *Lactobacillus plantarum*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana HI-Link pada Tahun 2012 dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan HI-Link Nomor : 01/UN.16/PM/HI-Link/VI/2012 Tanggal 11 Juni 2012 ketua Dr. Hj. Husmaini, MP; anggota Prof. Drh. Hj. Endang Purwati, MS., Ph.D.

REFERENSI

- Fuller, R. 1999. *Probiotics for farm animal. In Gerald W. Tannock. Probiotics A Critical Review.* Horizon Scientific Press, Wymondham, U. K.
- Purwati, E., Rusfidra, Akmandian, I. Juliyarsi dan H. Purwanto. 2010. Plasma Nutfah Sumatera Barat "Dadih sebagai Pangan Fungsional Probiotik Menunjang Kesehatan Masyarakat". Cendekia, Bogor.
- Pato, U. 2003. *Potensi Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Dadih Untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker.* Jurnal Natur Indonesia. Vol. 5 No.2 Hal. 162-166.
- Suryono. 2003. *Dadih : Produk Olahan Susu Fermentasi Tradisional Yang Berpotensi Sebagai Pangan Probiotik.* Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Widodo. 2003. *Bioteknologi Industri Susu.* Lacticia Press,

Yogyakarta.

- Putri, Ike. 2011. *Pengaruh Efektifitas BAL Terhadap Kualitas Mikrobiologi dan Daya Simpan Dadih di Beberapa Daerah Sumatera Barat*. Fakultas Peternakan Universitas Andalas. Padang.
- Pasaribu. 2010. *Kerbau Sebagai Penghasil Daging Dan Susu*. Manajemen dan Teknologi Publikasi Budidaya Ternak Ruminansia, Bogor.
- Aritonang, S. N. 2009. *Susu dan Teknologi*. Swagati Press, Cirebon.
- Sirait, C. H. 1991. *Pengolahan Susu*. Lembaga Penelitian Peternakan, Bogor.
- Data Base Peternakan Provinsi Sumatera Barat. 2009. *Produksi Telur dan Susu*.
- Sumaryati Syukur, Lidya Sari Utami, Endang Purwati, Urnemi and 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.
- Purwati, E., S. Syukur dan Z. Hidayat. 2005. *Lactobacillus sp. Isolasi Dari Biovicophitomega Sebagai Probiotik*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta

Komang, Gede Wiryawan dkk. 2005. *Isolasi dan Identifikasi BAL Penghasil Antimikroba*. Jurnal Veteriner.Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.

Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Universitas Riau Press, Riau.