

IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT *Lactobacillus paracasei* YANG ADA PADA LAPISAN MINYAK VCO

Suryani¹⁾, Dedi Nofiandi²⁾, Husni Mukhtar²⁾, Melona Siska²⁾, Abdi Dharma³⁾, Nasril Nasir³⁾

¹Fkes MIPA, Universitas Muhammadiyah Sumbar, Padang

² Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi, Padang.

³FMIPA, Universitas Andalas, Padang

suryani@umsb.ac.id

Submitted : 24-09-2017, Reviewed: 02-10-2017, Accepted: 04-10-2017

ABSTRAK

Virgin Coconut Oil adalah minyak dari fermentasi santan kelapa yang mempunyai banyak sekali kegunaan diantaranya dapat mencegah HIV, karena berfungsi sebagai antibakteri, antijamur dan antivirus. Zat antibakteri, antijamur dan antivirus itu terdapat pada bakteri asam laktat yaitu bakteriosin, berupa peptida yang dapat menghancurkan sel bakteri dan jamur patogen serta sel virus. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi secara molekular bakteri asam laktat yang telah diisolasi dan diidentifikasi secara morfologi dan uji – uji biokimia, dari santan yang difermentasi. Ternyata bakteri asam laktat nya adalah *Lactobacillus paracasei* strain 1.7.

Keywords Bakteri asam laktat; Identifikasi molekular; *Lactobacillus paracasei*; Virgin Coconut Oil

ABSTRACT

Virgin Coconut Oil is an oil of coconut milk fermentation that has many uses such as can prevent HIV, because it functions as antibacterial, antifungal and antiviral. Antibacterial, antifungal and antiviral agents are found in bacteria lactic acid bacteriocin, a peptide that can destroy bacterial cells and pathogenic fungi and viral cells. The aim of this study was to identify molecularly lactic acid bacteria isolated and morphologically identified and biochemical tests, from fermented coconut milk. Apparently lactic acid bacteria is *Lactobacillus paracasei* strain 1.7.

Keywords: Lactic acid bacteria; Molecular identification; *Lactobacillus paracasei*; Virgin Coconut Oil.

PENDAHULUAN

Virgin Coconut Oil (VCO) adalah minyak kelapa murni yang merupakan hasil fermentasi santan, bisa tanpa penambahan ragi atau stater yang dikatakan fermentasi tradisional (Suryani, Dharma et al. 2014); (Krishna et al. 2010) dapat juga dengan menggunakan stater (Rahayu et al. 2008); (Kumalaningsih & Padaga 2012); (Sathees Neela and N.B.L.Prasad 2012); (Djajasoepena et al. 2011). Manfaat VCO banyak sekali selain dapat menurunkan berat badan (An et al. 2011) dan mencegah osteoporosis (Hayatullina et al. 2012) juga dapat membantu menyembuhkan HIV, karena dapat berfungsi sebagai antibakteri, antijamur dan antivirus (Nurul-iman et al. 2013); (Press 2011); (Liau et al. 2011).

Faktor yang menyebabkan VCO banyak sekali manfaatnya adalah karena VCO mengandung asam lemak rantai sedang seperti asam laktat (Krishna et al. 2010); (Marina & Man 2009) disamping juga disebabkan santan merupakan bahan yang mengandung karbohidrat tinggi dan protein tinggi yang bila difermentasi akan terdapat bakteri asam laktat (BAL) (Abdel-rahman et al. 2011); (Bischoff et al. 2010); (Chen et al. 2010); (Dwi et al. 2012). Bakteri asam laktat mempunyai komponen bakteriosin berupa peptida yang mempunyai kemampuan menghancurkan sel bakteri patogen (Elamathy & Kanchana 2013); (Fangio & Fritz 2014).

Ada beberapa penelitian tentang bakteri asam laktat mengandung bakteriosin yang telah diisolasi dari berbagai bahan seperti (Kalmokoff et al. 2003); (Paracasei et al. 2010); (Suryani 2016) dan juga telah ada bakteri asam laktat itu yang diidentifikasi molekular (Birri et al. 2010) tetapi belum ada yang mengisolasi bakteri asam laktat *Lactobacillus paracasei* yang ada pada minyak VCO, dan juga belum ada yang mengidentifikasi secara molekular.

Karena itu perlu dilakukan penelitian mengidentifikasi secara molekular bakteri asam laktat yang ada pada minyak VCO. Selanjutnya akan dapat dikembangkan mempelajari analisa antibakterinya terhadap berbagai penyakit berbahaya (menyebabkan kematian) yang disebabkan oleh bakteri patogen seperti Otitis Media Supuratif Kronis, dimana telah diketahui beberapa bakteri patogen nya (Suryani, Dharma et al. 2016).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dari bulan April sampai September 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Kopertis X Sumbar Riau Jambi Kepri dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Bahan yang digunakan adalah : Media NA agar dan, MRS (15 g pepton, 5g ekstrak yeast, 10 g dekstrosa, 5 g jus tomat, 2 g mono potassium fosfat, dan 1 g polisorbit 80), media LB /Luria Bertani (10 g Tripton, 5 g ekstrak Yeast dan 10 g NaCl), Natrium asetat, Nitrogen cair, Biru metilen, aquades steril, Natrium azida, HCl 6 N, ampicilin, ammonium sulfat, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M, Tris – HCl 100 mM pH 8,5, buffer TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA pH 7,6), gliserol, sephadex G-50, methanol 100%, MOPS (Asam 4-morfolinopropanafosfat sulfonat), iso propanol, etanol 70 %, MgCl₂, ATP, , Tris-HCl 50 mM pH 7,4 polivinil alcohol, ammonium molibdat, Natrium sitrat, aquabidest, methanol, Agar murni, alkohol 70%, 96%, amonium sulfat (NH₄)₂SO₄, Aquades, buffer solution pH 7.00 analisis, hidrogen peroksida (H₂O₂) teknis, yeast extract agar, potassium hidroksida (KOH), phenolphthalein (PP) analisis, Amilum (indikator kanji) teknis, lactose broth, IPTG, buffer B, buffer elusi, buffer dialysis, loading dye, lisozim (60 mg/mL), SDS 10 %, NaCl 5M, CTAB 10%, RNase, buffer PCR, primer revers, Taq, bromphenol blue, coomassie brilliant blue, bovin serum albumin (BSA), BCA kit, , kit pewarnaan perak, dan marker protein 1700-42000 Da, untuk analisis bobot molekul bakteriosin, TEMED, chloroform, isopropanol, dNTP, primer forward, aquades dingin, machite green, ammonium sulfat, sukrosa, akrilamid, ammonium persulfat. Marker protein 250 kDa digunakan untuk analisis bobot molekul RNA helikase

Adapun penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yaitu: 1). Isolasi bakteri asam laktat, Bakteri asam laktat diisolasi dengan menggunakan media selektif MRS agar dengan

menambahkan 0,3 % CaCO_3 . Reaksi antara 0,3 % CaCO_3 akan menyebabkan terjadinya daerah “halo” yang menandakan koloni yang tumbuh adalah bakteri asam laktat 2) Identifikasi secara morfologi, Identifikasi dilakukan dengan melihat bentuk molekulnya, warna sel atau sifat fisik dari koloni sel bakteri 3) Identifikasi dengan uji-uji biokimia Identifikasi ini dilakukan dengan uji karbohidrat, uji gula, uji H_2O_2 dan juga uji gram dan 4) Identifikasi molekular. Analisa ini dimulai dengan isolasi DNA genom dari sel menggunakan buffer lisis. DNA genom selanjutnya iampifikasi/diperbanyak pada daerah 16S rDNA dengan teknik PCR menggunakan primer 63f dan 1387r. Proses amplifikasi diawali dengan pemanasan awal 94°C selama 2 menit, kemudian dilakukan siklus denaturation, annealing dan elongation berturut-turut 94°C selama 30 detik, 55°C selama 40 detik dan 72°C selama 30 detik berlangsung sebanyak 30 siklus. Lalu diakhiri dengan final extension selama 5 menit pada suhu 72°C . Selanjutnya dielektroforesis, urutan basa nukleotida amplikon tersebut dibaca dengan menggunakan instrumen ABI PRISM 310 Genetik Analyzer. Urutan basa nukleotida selanjutnya dianalisis menggunakan program BLAST pada situs NCBI. Untuk mengetahui filogeni/kekerabatan dengan organisme lain, hasil sekuensing 16S rDNA tersebut dibandingkan dengan data sekuen 16S rDNA beberapa spesies yang diperoleh dari bank data. Data sekuen 16S rDNA tersebut kemudian dialignment dengan program clustalX ver 2.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian ini didapatkan hasil seperti berikut:

1. Isolasi Bakteri Asam Laktat.

Isolasi Bakteri Asam Laktat dilakukan dengan menggunakan media MRS agar + 0,3% CaCO_3 dengan mengambil tiap lapisan dari hasil fermentasi santan diencerkan sampai pengenceran 10^{-7} . Dari pengerjaan isolasi Bakteri Asam Laktat didapatkan 69 isolat yang diambil dari koloni yang menunjukkan zone jernih disekitarnya, disimpan dalam gliserol dan digunakan untuk analisa selanjutnya yaitu pengerjaan identifikasi BAL tersebut.

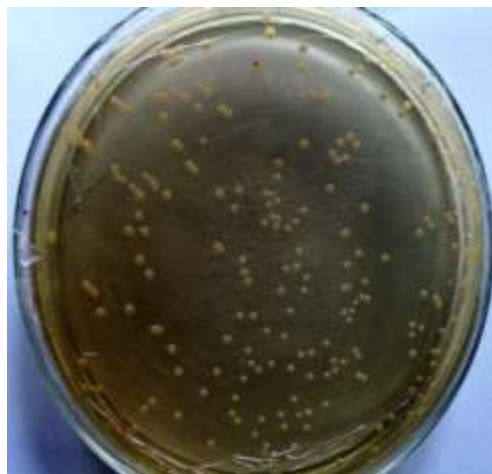


Gambar 1. Koloni BAL hasil isolasi

Pada Gambar 1 dapat dilihat yang menghasilkan daerah “Halo” atau daerah yang jernih menandakan bahwa koloni itu adalah bakteri asam laktat. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan (Dwi et al. 2012) dimana dia memfermentasi bakteri asam laktat dari fermentasi *Growol* makanan tradisional Indonesia, dengan menggunakan media MRS agar ditambah dengan 1,5 % CaCO_3 , (Nguyen et al. 2010) juga menggunakan media MRSA ditambah

dengan 1 % CaCO_3 pada saat mengisolasi bakteri asam laktat dari fermentasi *Nem chua* makanan tradisional Vietnam, (Hoque et al. 2010) menggunakan media MRSA ditambah dengan 1 % CaCO_3 pada saat dia mengisolasi bakteri asam laktat dari induk abalon, koloni yang diindikasikan adalah bakteri asam laktat tumbuh dengan adanya zone jernih di sekitarnya. Daerah “Halo” ini terjadi karena BAL menghasilkan asam laktat dan asam-asam organik lainnya dalam jumlah besar, di mana asam ini akan bereaksi dengan basa CaCO_3 yang ditambahkan dengan reaksi netralisasi sehingga daerah yang berada di sekitar koloni yang mengandung asam dinetralkan dan menghasilkan daerah yang bersih atau zone bening. Tapi jumlah koloni yang tumbuh sedikit (37 koloni).

Bila hanya menggunakan media MRSA saja didapatkan koloni bakteri yang tumbuh berwarna kekuningan, cembung dan agak mengkilat. Seperti yang dilakukan oleh (Hoque et al. 2010); (Margino 2012). Koloni yang tumbuh hampir sama saja satu dengan yang lainnya, tidak dapat dipastikan bahwa koloni ini adalah koloni bakteri asam laktat. Untuk memastikan bahwa ini adalah koloni BAL maka dilanjutkan dengan mengidentifikasinya menggunakan KIT API CHL 50.

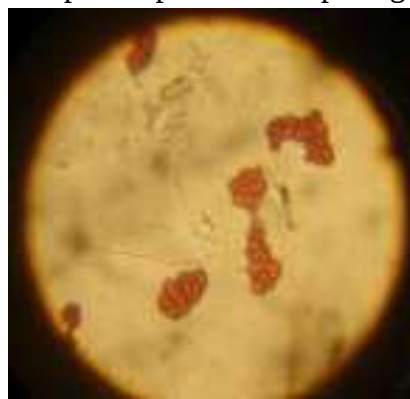


Gambar 2. Koloni yang tumbuh dengan menggunakan media MRS Agar saja.

2. Identifikasi morfologi.

Hasil identifikasi secara morfologi adalah sebagai berikut:

- Koloni bakterinya non spora seperti terlihat pada gambar 3 berikut:



Gambar 3. Memperlihatkan bahwa bakteri non spora.

- Bakteri berbentuk batang
Seperti gambar 4 berikut,



Gambar 4. yang menunjukkan bahwa bakteri berbentuk batang (Basil)

- Isolat bersifat gram positif
- Bersifat non motil
- Fakultatif an aerob
- Heterofermentatif

Hasil identifikasi secara morfologi mengarah ke bakteri *Lactobacillus paracasei*, sesuai dengan (Sunaryanto 2014)

3. Uji-uji biokimia.

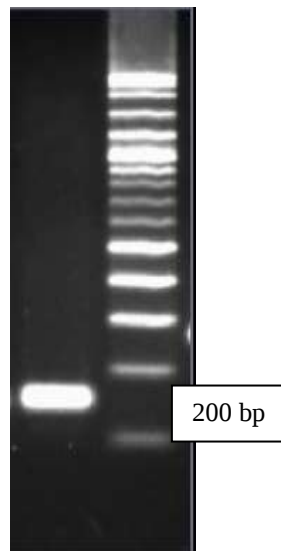
Hasil uji-uji biokimia dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil uji-uji biokimia

Biochemical test	
• Galactose	+
• Lactose	+
• Glucose	+
• Sucrose	+
• Maltose	+
Nitrate Reduction	-
H ₂ S	-

4. Identifikasi molekular

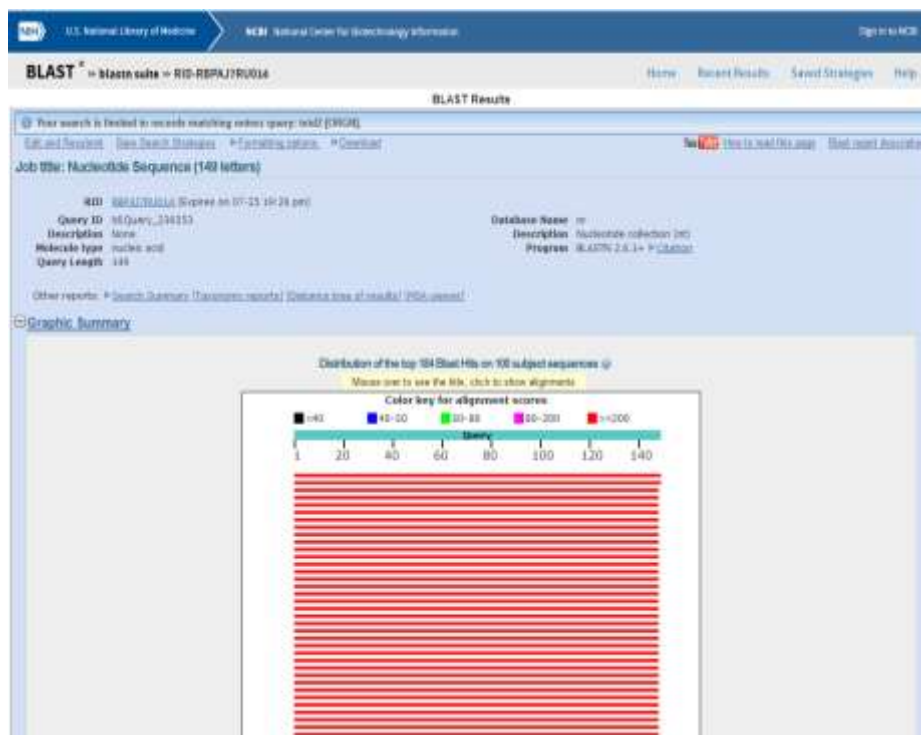
Hasil identifikasi molekular dari isolat yang sudah mengarah ke *Lactobacillus paracasei* adalah seperti berikut:



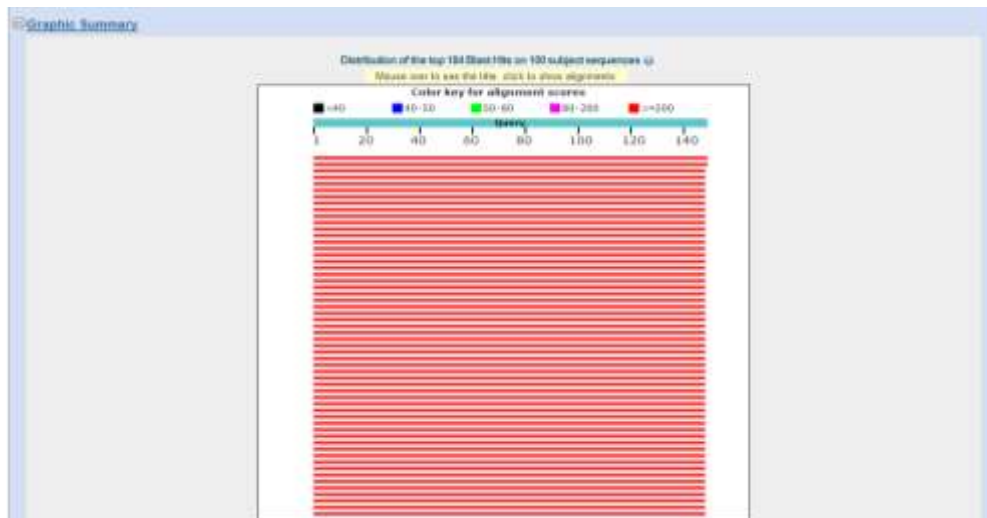
Gambar 5. Hasil running elektroforesis DNA bakteri isolat BAL yang diduga *Lactobacillus paracasei*

Consensus :

CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGA
GTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGT
CTAAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAA



Gambar 6. Urutan DNA sampel isolat bakteri asam laktat



Gambar 7 . Alinmen gen bakteri sampel yang mengarah ke bakteri *Lactobacillus paracasei*

SIMPULAN

Penelitian yang telah diuraikan diatas diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi bakteri asam laktat dengan menggunakan media selektif MRS agar + 0,3% CaCO_3 didapatkan koloni yang berada di daerah “Halo”. Dengan jumlah sedikit (37 koloni).
2. Identifikasi morfologi menunjukkan isolat berbentuk batang, bersifat hetero fermentatif, non motil, ,dan fakultatif anaerob.
3. Uji gram menunjukkan Gram positif
4. Uji biokimia adalah positif terhadap gula-gula Glukosa, maltosa, sukrosa dan negatif terhadap H_2S
5. Identifikasi molekuler menunjukkan isolat adalah *Lactobacillus paracasei* 1.7.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik karena banyak pihak yang membantu untuk kelancaranannya, yaitu sebagai berikut:

1. DRPM Dikti yang telah memberikan kesempatan untuk meneliti dengan dana skema Fundamental tahun anggaran 2016 dan 2017.
2. Ibu Prof.Dr.Hj. Rahmiana Zein, yang telah memberikan ide untuk terlaksananya judul penelitian ini.
3. Kepala Laboratorium Biokimia Kopertis X
4. Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-rahman, M.A. et al., 2011. Production from Xylose by a Novel Lactic Acid Bacterium , *Enterococcus mundtii* QU Efficient Homofermentative L - (C) -Lactic Acid Production from Xylose by a Novel Lactic Acid Bacterium , *Enterococcus mundtii* QU 25 □. *Applied and Enviromental Microbiology*.

- An, H.M. et al., 2011. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp . in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), p.116. Available at: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/116>.
- Birri, D.J. et al., 2010. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Bacteriocin Locus in Enterococcus avium Isolates from Infants Molecular and Genetic Characterization of a Novel Bacteriocin Locus in Enterococcus avium Isolates from Infants □. *Applied an Enviromental Microbiology*, 76(2), pp.483–492.
- Bischoff, K.M. et al., 2010. Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile Bacillus coagulans. *Biotechnol Lett*, 32, pp.823–828.
- Chen, Y. et al., 2010. Lactobacillus pobuzihii sp . nov ., isolated from pobuzihi (fermented cummingcordia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp.1914–1917.
- Djajasoepena, S., Suprijana, O. & Resmelia, M., 2011. Virgin coconut oil production by fermentation using Saccharomyces cerevisiae. In *2nd. International seminar on Chemistry*. p. 19413.
- Dwi, W. et al., 2012. ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK SELAMA FERMENTASI GROWOL , MAKANAN TRADISIONAL Isolation and Characterization of Amylolytic Lactic Acid Bacteria during Growol Fermentation , an Indonesian Traditional Food. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(1), pp.52–60.
- Elamathy, S. & Kanchana, D., 2013. Characterization of heat stable and inhibitory activity of bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. *International Journal of Chem Tech Research*, 5(3), pp.1281–1283.
- Fangio, M.F. & Fritz, R., 2014. Potential use of a bacteriocin-like substance in meat and vegetable food biopreservation. *International Food Research Journal*, 21(2), pp.677–683.
- Hayatullina, Z. et al., 2012. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Hoque, M.Z. et al., 2010. Isolation , Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp . From Selective Regional Yoghurts. *World Journal of Diary & Food Science*, 5(1), pp.39–46.
- Kalmokoff, M.L. et al., 2003. Butyriovibriocin AR10 , a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe Butyriovibrio fibrisolvens AR10 : characterization of the gene and peptide ., 773, pp.763–773.
- Krishna, G. et al., 2010. Coconut Oil : Chemistry , Production and Its Applications - A Review. *Indian Coconut Journal*, pp.15–27.
- Kumalaningsih, S. & Padaga, M., 2012. The Utilization of Microorganisms Isolated From Fermented Coconut Milk For The Production of Virgin Coconut Oil. *Journal of Basic and Aplied Scientific Research*, 2(3), pp.2286–2290.
- Liau, K.M. et al., 2011. An Open-Label Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Virgin Coconut Oil in Reducing Visceral Adiposity. *International scholarly Research Network*, 2011.
- Margino, S., 2012. PENGHASIL BAKTERIOSIN SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERIA PADA PRODUK-PRODUK HASIL PERIKANAN. *Jurnal Saintek Perikanan*, 8(1), pp.59–64.
- Marina, A.M. & Man, Y.B.C., 2009. Virgin coconut oil : emerging functional food oil. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), pp.481–487. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.06.003>.

- Nguyen, H.T.H. et al., 2010. Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua , a traditional fermented meat from Vietnam. *Beneficial Microbes*, 1(1), pp.67–74.
- Nurul-iman, B.S. et al., 2013. Virgin Coconut Oil Prevents Blood Pressure Elevation and Improves Endothelial Functions in Rats Fed with Repeatedly Heated Palm Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Paracasei, L. et al., 2010. Characterization of the bacteriocin-producing strain. *Arch.Biol.Sci, Belgrade*, 62(4), pp.889–899.
- Press, D., 2011. Preparation of silver nanoparticles in virgin coconut oil using laser ablation. *International Journal of Nanomedicine*, 6, pp.71–75.
- Rahayu, R.D., Sulistyo, J. & Dinoto, A., 2008. Enzymatic properties of microbial solid starters on coconut oil recovery. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*, pp.648–652.
- Sathees Neela and N.B.L.Prasad, 2012. Induced fermentative production of virgin coconut oil. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 5(05), pp.355–363.
- Sunaryanto, R., 2014. UJI KEMAMPUAN *Lactobacillus casei* SEBAGAI AGENSIA PROBIOTIK. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains*, 01(01), pp.9–15.
- Suryani, A.D., 2016. Isolation and Characterization of Bacteriocins Bacteria *Lactobacillus Plantarum* Strain NM178-5 from Fermentation Process with Contained on Coconut Milk. *Transylvanian Reviwer*, XXIV(6), pp.614–628.
- Suryani, Dharma, A. et al., 2014. Antimicrobial and Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Coconut Milk Fermentation . *Research Journal of Pharmaceutical and Biological and Chemical Sciences*, 5(1587), pp.1587–1595.
- Suryani, Dharma, A. et al., 2016. ISOLASI BAKTERI PATOGEN PADA PASIEN PENDERITA INFEKSI TELINGA Chronic supparative otitis media (OMSK). *KATALISATOR*, pp.1–10.