

IDENTIFIKASI GENETIK *LACTOBACILLUS* DALAM FERMENTASI AIR CUCIAN BERAS DENGAN PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)**GENETIC IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS* IN FERMENTATION OF RICE WATER RINSE USING PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)**

Rehmadanta Sitepu*, Sophia Yusnita Wahyu Timur, Rollando Rollando
Program Studi Farmasi, Universitas Ma Chung, Jawa Timur, Indonesia

*Penulis Korespondensi, e-mail: rehmadanta.sitepu@machung.ac.id

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) sangat baik digunakan dalam pencegahan efek samping bakteri patogen. Bakteri ini termasuk dalam golongan bakteri baik dan menguntungkan yang memiliki peranan besar untuk mencegah dan mengurangi pertumbuhan bakteri patogen. Sisa air cucian beras terkandung kikisan dari karbohidrat sehingga dapat digunakan BAL untuk berkembangbiak. Fermentasi air cucian beras diidentifikasi untuk mengetahui kandungan BAL spesifik yang terdapat didalamnya menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Identifikasi ini dilakukan menggunakan tahapan-tahapan metode yang dimulai dari pencarian isolat murni, uji aktivitas antimikroba, uji katalase, ekstraksi DNA, siklus PCR dan elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian terbentuk pita pada kisaran 300 bp yang artinya kedua primer terdeteksi dikarenakan *Lactobacillus casei* berada pada 254 bp sedangkan *Lactobacillus rhamnosus* berada pada 159 bp pada fermentasi air cucian beras.

Kata kunci: BAL, *lactobacillus*, PCR

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (BAL) are the good choice to reduce adverse effect of pathogenic bacteria. These kinds of bacterias are good and having a large role to prevent and reduce the growth of pathogenic bacteria. In rice washing water, there is erosion of carbohydrates so that BAL can use it for breeding. Fermentation of rice washing water were identified to determine the specific BAL content using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The methods that were conducted to get pure isolates, tests for antimicrobial activity, catalase testing, DNA extraction, PCR cycles and agarose gel electrophoresis. The results of the study formed a band in the range of 300 bp which means that both primers were detected because *Lactobacillus casei* was at 254 bp while *Lactobacillus rhamnosus* was at 159 bp in rice washing water fermentation.

Keywords: BAL, *lactobacillus*, PCR

PENDAHULUAN

Kesehatan pencernaan menjadi salah satu hal pokok yang harus dijaga, karena sistem pencernaan bekerja meneruskan asupan nutrisi dan mengedarkannya ke seluruh tubuh, saluran pencernaan rawan terhadap bakteri dan menyebabkan infeksi apabila tertelan dan masuk ke saluran pencernaan (Poeker et al., 2018). Bakteri patogen merupakan sumber utama terjadinya proses infeksi, dua diantaranya adalah *Staphylococcus aureus* yakni penyebab mastitis, pneumonia, meningitis, endocarditis/ sepsis dengan supurusi di tiap organ, lebih buruknya dapat menginfeksi peradangan lewat vena dan trombosis.

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang mampu memfermentasikan gula menjadi asam laktat dalam usus besar dengan cara menghambat pertumbuhan mikroba patogenik dan mikroba pembusuk sehingga keseimbangan mikroflora alami dalam usus akan selalu terjaga (Putra, 2015). BAL memanfaatkan karbohidrat sebagai substrat penghasil metabolit aktif pada proses pertumbuhannya. Air bilasan cucian beras masih mengandung zat-zat penting seperti karbohidrat, protein dan vitamin yang terbawa saat pencucian. Dengan adanya peranan besar BAL, maka perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai isolasi BAL dari fermentasi air cucian beras hingga mengidentifikasi karakteristik spesifik yang terkandung dalam limbah air cucian beras (Reuter et al., 2002). Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Sensitivitas PCR membuatnya mampu melipatgandakan suatu molekul DNA. Konsep teknologi PCR mensyaratkan bagian tertentu dari sekuens yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu untuk menyamakan primer spesifik yang akan digunakan, yaitu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA (Cullen et al., 2001). Molekul gen yang digunakan untuk mengidentifikasi BAL pada fermentasi air cucian beras menggunakan 16S RNA ribosomal.

Identifikasi BAL dengan aktivitas prebiotik yang tinggi menjadi tujuan utama dalam penelitian ini. Efek prebiotik sangat penting karena dapat meningkatkan kesehatan usus, mengurangi resiko kanker, meningkatkan kesehatan jantung, dan sebagai antiobesitas (Singh et al., 2015). Identifikasi BAL dengan aktivitas prebiotik tinggi terhadap komposisi karbohidrat dari beras merupakan kebaruan yang diharapkan dalam studi ini, sehingga memberikan dampak prebiotik yang lebih spesifik bagi masyarakat Indonesia yang pangan utamanya adalah beras.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat penelitian eksperimen dengan melakukan pembiakan bakteri pada media yang sesuai, melakukan fermentasi air cucian beras, serta melakukan identifikasi biokimia dan genetika untuk menentukan spesies bakteri yang terkandung di dalam air cucian beras yang sudah difermentasi.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemanas dengan *magnetic stirrer*, autoklaf (All American Type 75X), laminar air flow cabinet, pH meter (ATC), timbangan analitik (Ohaus PA214 SKZO), lemari pendingin (LG), deep freezer -40°C (Sharp), oven (LG), vortex *mixer* (Ika vortex), mikrosentrifus (Sigma), inkubator (Orbital Shaker Incubator), alat elektroforesis gel mini (Bio-Rad), UV-transiluminator, thermal cycler, mini-spin, GD column. Bahan yang digunakan antara lain sampel (bahan baku beras), media MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) agar, media MRS broth, bacteriological pepton 1%, dapar TE, *water for PCR*, Firepol PCR mastermix (Solis BioDyne), 1 kb plus DNA, etanol 70 %, agarose *ultra pure*, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, diamond nucleic acid dye, gliserol, dekstrosa, NaCl, CaCO₃, natrium asetat, tween 80, etil asetat, NaOH, minikit Geneaid (EDTA, GT buffer, GB buffer, elusion buffer, wash buffer, TAE buffer).

Preparasi Sampel

Sejumlah 50 gram beras dicuci dengan 80 mL air mengalir, air bilasan pertama ditampung ke dalam wadah kaca steril. Mulut wadah ditutup menggunakan kain atau kertas saring dan diikat dengan tali. Proses fermentasi dilakukan selama 3 hari. Penyimpanan dilakukan pada suhu ruang terhindar dari cahaya (Susilawati, 2016). Sampel yang diambil adalah cairan keruh yang terdapat pada lapisan tengah hasil fermentasi limbah air cucian beras.

Isolasi Bakteri

Satu mL sampel bakteri ditambahkan ke dalam 9 mL *bacteriological pepton* 1% secara aseptis. Isolat kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*, suspensi yang diperoleh merupakan suspensi dengan pengenceran 10^{-1} . Tahapan berikutnya adalah suspensi akan diencerkan hingga pengenceran 10^{-7} dengan cara mengambil 1 mL dari hasil pengenceran sebelumnya ke dalam 9 mL *bacteriological pepton* 1%. Cawan petri berisi media MRS yang ditambahkan pada CaCO₃ 1%

kemudian hasil pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-7} diambil sebanyak 100 μ L dan dimasukkan pada *plate* petri dengan metode sebaran (*spread plate*) secara diplo, hasil isolasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari (Suhartatik et al, 2014 dalam Susilawati, 2016).

Pemurnian Isolat Bakteri

Strain bakteri murni diperoleh pada zona bening di sekeliling koloni bakteri setelah diinokulasikan pada media agar baru dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tahap pemurnian dilakukan 5 kali untuk memperoleh isolat murni, kultur murni disimpan pada media MRS agar miring pada suhu 4°C-10°C (Widowati and Misgiyarta, 2002).

Uji Antimikroba

Isolat hasil fermentasi limbah air cucian beras dilakukan uji kemampuan antimikroba dengan menggunakan media NA (*Nutrient Agar*). Bakteri patogen yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji disuspensikan kedalam 2 mL larutan NaCl 0,9% sehingga larutan keruh. Sebanyak 25 μ L bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan metode *pour plate*. Disiapkan kertas cakram kemudian direndam dalam isolat hasil fermentasi limbah air cucian beras selama 25 menit. Kertas cakram yang sudah berisi isolat selanjutnya diletakkan pada permukaan media uji, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Ismail and Yulvizar, 2017).

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Diukur diameter zona bening secara vertikal dan horizontal menggunakan jangka sorong (satuan milimeter). Daerah bening menunjukkan kepekaan yang terjadi antara bakteri dengan bahan uji.

Uji Katalase

Isolat hasil fermentasi yang berumur 24-48 jam digunakan untuk uji katalase. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri gram pada isolat tersebut. Isolat bakteri asam laktat diambil satu ose, diletakkan pada kaca objek kemudian ditetesi dengan H₂O₂ 3%. Hasil positif akan menunjukkan terbentuknya gelembung udara yang memiliki arti bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ (Ismail and Yulvizar, 2017).

Purifikasi Isolat

Isolat yang tumbuh digoreskan ke media agar MRS kemudian dilakukan proses inkubasi. Isolat yang didapatkan ditanam pada media MRS agar miring dan dilakukan proses peremajaan setiap 2 minggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur dari agar miring ke cawan petri. Setelah diperoleh koloni tunggal, isolat ditanam kembali pada media agar miring dengan pengejaan duplo, yaitu sebagai kultur stok dan kultur kerja.

Isolat kultur stok disimpan dalam gliserol dan 0,25 dapar TE dan dimasukkan dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL, disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C kemudian disimpan pada suhu 30°C. Sebanyak 0,5 mL kultur yang telah diinkubasi 24 jam dalam media MRS cair dimasukkan ke dalam tabung mikrosentifus, dikocok dengan vortex, disimpan pada suhu -70°C untuk penyimpanan jangka panjang. Isolat didapatkan kembali dengan goreskan pada media MRS agar.

Ekstraksi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan minikit Geneaid. Tahapan isolasi dikerjakan sesuai dengan prosedur yang tercantum pada minikit. Dua puluh μL sampel ditambahkan dengan 200 μL GB *buffer*. Suspensi selanjutnya diinkubasi dengan pemanasan suhu 60°C menggunakan *elusion buffer*. Dua ratus μL etanol ditambahkan ke dalam sampel dan dikocok kuat. GD *column* dimasukkan ke dalam 2 mL *tube* dan campuran sebelumnya dipindahkan ke dalam GD *column*. GD *column* disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 x.g selama 2 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan dari GD *column* ke *tube* baru. Selanjutnya hasil sentrifugasi ditambahkan 400 μL W1 *buffer*, disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 x.g selama 30 detik. Isolat kemudian ditambahkan 600 μL wash *buffer* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 x.g selama 30 detik. Isolat dipindahkan ke dalam *tube* 1,5 mL dan kemudian ditambahkan 100 μL *elusion buffer* yang sudah dipanaskan. Sampel dibiarkan selama 3 menit. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 x.g selama 30 detik untuk melulusi DNA yang sudah dimurnikan.

Persiapan PCR

Air bebas nuklease ditambahkan sebanyak 13 μL ke dalam microtube 0,2 mL. Sampel diresuspensikan terlarut sempurna dengan air bebas nuklease. Sampel ditambahkan primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 1 μL . Sebanyak 0,5 μL sampel (DNA cetakan) dipindahkan ke dalam mikrotube 0,2 mL lainnya. *Firepol mastermix* dimasukkan dalam ke dua tabung mikro

tersebut masing-masing sebanyak 4 μ L. Volume akhir yang diperoleh yaitu sebanyak 20 μ L. Larutan siap untuk dimasukkan ke dalam alat *thermal cycler* PCR.

Kondisi PCR diatur sebagai berikut: Pra-siklus, dengan suhu 95°C selama 4 menit. Siklus 30 kali, dengan suhu 94°C selama 45 detik merupakan proses denaturasi. Suhu diturunkan hingga 55°C selama 45 detik sebagai proses penempelan. Suhu dinaikkan kembali hingga 72°C selama 1 menit sebagai proses ekstensi. Pasca-siklus suhu dinaikkan kembali pada kisaran 94°C selama 7 menit. Tahap terakhir sebagai penyimpanan yakni suhu 8°C selama 10 menit.

Analisis Amplikon Dengan Elektroforesis Agarosa

Prosedur pelaksanaan sama dengan prosedur analisis DNA genom bakteri hasil ekstraksi yang tertulis sebelumnya. Perbedaannya terletak pada penambahan 1 kb plus DNA *ladder* sejumlah 5 μ L dan *loading buffer* sejumlah 3 μ L. Agarosa sebanyak 0,2 g dalam 20 mL tris Asetat EDTA (TAE) 1 x steril dididihkan. Setelah agak dingin, larutan tersebut dituang pada cetakan gel, sisir dipasang dan didiamkan hingga membeku. Sisir diangkat dan nampan dipindahkan ke wadah elektroforesis. Wadah tersebut diberi dapar TAE 1x hingga menggenangi permukaan gel agarosa.

Loading buffer sebanyak 2,5 μ L ditambahkan pada sejumlah 3 μ L ekstrak DNA disuspensikan dengan pemipetan. Campuran tersebut dimuatkan ke dalam sumur gel yang tersedia dengan hati-hati. Elektroforesis dinyalakan dan tegangan diatur sebesar 150 volt. Setelah itu, alat dijalankan hingga *xylene cyanol* mencapai 1cm dari tepi bawah gel. Metode pewarnaan dapat dilakukan dengan mencampurkan 1 μ L *Diamond Nucleic Acid Dye* dengan TAE 100 mL setelah agarosa diangkat dari elektroforesis. Hasil diamati pada UV transluminator pada panjang gelombang 260 nm dan divisualisasi.

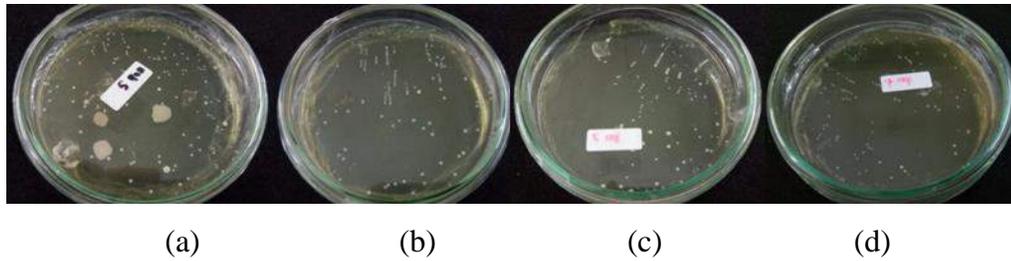
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses fermentasi dilakukan menggunakan metode fermentasi spontan yaitu fermentasi yang berjalan secara alami tanpa penambahan starter tetapi media yang digunakan tetap dikondisikan agar mikroba pemicu fermentasi dapat tumbuh dengan baik. Proses fermentasi asam laktat dimulai dari jalur glikolisis menghasilkan asam piruvat heterofermentatif dan heterofermentif. Homofermentatif menggunakan glikolisis jalur EMP dan pada jalur heterofermentatif menggunakan glikolisis oleh enzim asam laktat dehidrogenase dan direduksi oleh NADH untuk menghasilkan energi dan asam laktat (Bulut et al., 2005).

Tahap pemurnian dilakukan sebanyak 5 kali pada kondisi dan media yang sama untuk mendapatkan koloni tunggal dan murni. Pengerjaan selalu dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk memperkecil kemungkinan kontaminasi pada bakteri yang akan diuji. Hasil proses isolasi pada penelitian ini diperoleh 4 isolat bakteri pada tiap pengenceran (dari 10^{-5} hingga 10^{-7}) sampel dengan penambahan *starter* ragi dan tanpa *starter* ragi (non ragi). Penambahan CaCO_3 pada media agar MRS digunakan sebagai pereaksi asam laktat yang akan membentuk Ca-laktat yang larut dalam medium (Suciati et al., 2019).

Rata-rata isolat yang tumbuh pada media MRSA memiliki hasil visualisasi bentuk yang sama tetapi pada hasil pengenceran non ragi 10^{-5} terdapat koloni berdiameter besar yang berbeda dengan koloni isolat lain. Dengan adanya perbedaan tersebut maka dibuat replikasi 2 kali untuk melihat perbedaan yang terjadi ketika proses pemurnian, hasil isolasi pertama menunjukkan bahwa keempat sampel menghasilkan isolat bakteri asam laktat yang cukup banyak. Setelah tumbuh dipilih satu koloni terpisah dari koloni lainnya, kemudian dipindahkan dan digoreskan pada media baru. Namun, pada penelitian kali ini koloni yang didapat ketika digoreskan pada media baru ukurannya akan lebih mengecil dan membentuk koloni lebih banyak, hal inilah yang menghambat proses pemurnian isolat karena sulit untuk mengambil satu koloni dari banyak koloni yang berhimpitan satu sama lain.

Pengamatan morfologi koloni isolat adalah seluruh isolat membentuk koloni yang berbentuk bulat berwarna putih sampai kekuningan (Handayani and Sustriawan, 2012) dengan diameter ukuran yang berbeda-beda. Empat isolat BAL yang telah didapat dari hasil metode sebaran (*spread plate*) kemudian dimurnikan dengan melakukan pengenceran bertahap. Pada penelitian ini diperoleh hasil pengenceran dengan empat hasil isolate, yaitu satu isolat dengan *starter* ragi dari hasil pengenceran 10^{-5} , dan isolat pengenceran 10^{-5} tanpa *starter* ragi (non ragi), isolat dengan *starter* ragi pengenceran 10^{-7} , dan isolat tanpa *starter* ragi (non ragi) pengenceran 10^{-7} . Dari hasil selama inkubasi dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi tingkat pengenceran maka koloni yang terbentuk lebih sedikit, seperti yang terlihat pada Gambar 1.

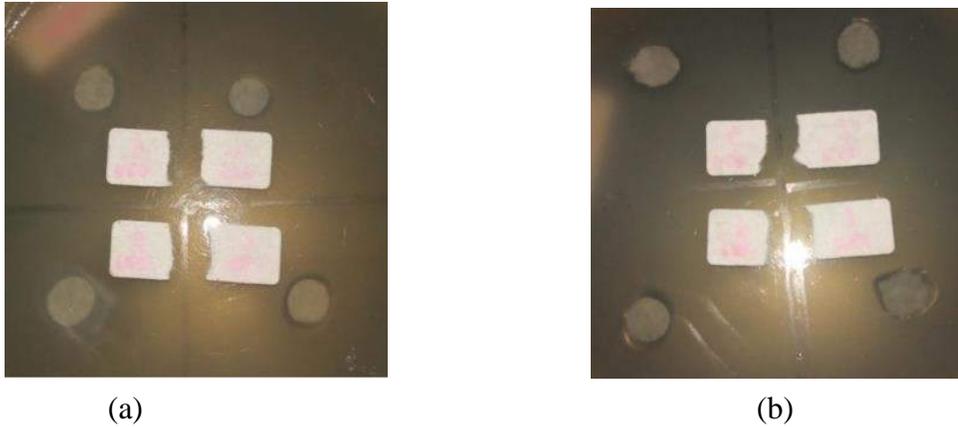


Gambar 1. (a) Isolat hasil pengenceran non ragi 10^{-5} ; (b) Isolat hasil pengenceran non ragi 10^{-7} ; (c) Isolat hasil pengenceran dengan *starter* ragi 10^{-5} ; (d) Isolat hasil pengenceran dengan *starter* ragi 10^{-7} .

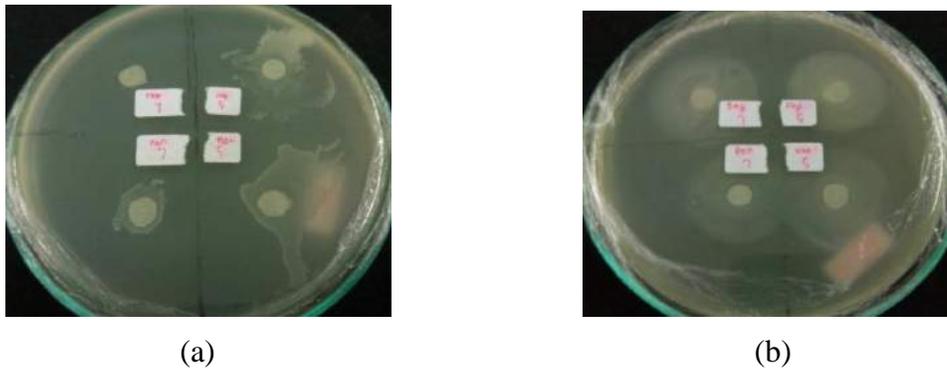
Hasil purifikasi lebih ditegaskan lagi dan hasil lebih baik dari pengulangan pemurnian isolat tahap 5 karena, isolat BAL tumbuh sesuai alur goresan ose, namun isolat yang dihasilkan paling kecil dari proses pemurnian sebelumnya. Hasil isolat yang menunjukkan pertumbuhan satu koloni selanjutnya ditumbuhkan pada media MRS Agar miring, hal ini dilakukan agar pertumbuhan isolat lebih kompleks karena ruang media yang terbatas dibandingkan dengan petri. Hasil inkubasi dari media MRS Agar miring selanjutnya dipindahkan pada media MRS *Broth*, tujuan penggunaan media cair untuk mempermudah proses suspensi pada tahap ekstraksi DNA. Mekanisme BAL dengan bakteri patogen yakni menekan mikroorganisme dengan memproduksi substansi antibakteri seperti bakteriosin sehingga akan menurunkan beberapa enzim kolon seperti glukoronidase, glukosidase, nitroreduktase, azoreduktase, *denydroxylase* dan steroid-7 yang mempunyai efek karsinogenik (Wu et al., 2021).

Hasil isolat selanjutnya ditubuhkan pada media MRS Agar miring, hal ini dilakukan agar pertumbuhan isolat lebih kompleks karena ruang media yang terbatas dibandingkan dengan petri. Hasil inkubasi dari media MRS Agar miring selanjutnya dipindahkan pada media MRS *Broth*, tujuan penggunaan media cair untuk mempermudah proses suspensi pada tahap ekstraksi DNA.

Aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi cakram secara *pour plate*. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* (Gambar 2) dan *Staphylococcus aureus* (Gambar 3). Antimikroba yang digunakan adalah bakteri asam laktat pada fermentasi air cucian beras. Antimikroba yang digunakan memiliki aktivitas yang cukup signifikan. Aktivitas antimikroba secara kualitatif diuji dengan menggunakan metode difusi cakram. Mikroba uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Antimikroba yang digunakan adalah BAL dari fermentasi air cucian beras. Kontrol positif dan negatif tidak diberikan pada penelitian ini. Semua peralatan disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoklav* untuk meminimalisir kontaminasi.

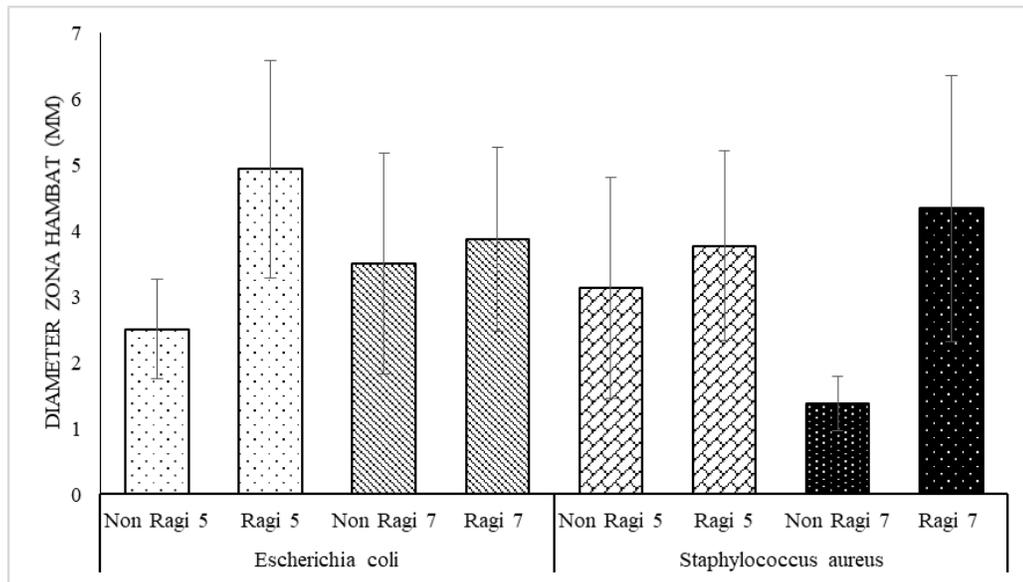


Gambar 2. Aktivitas antimikroba inkubasi hari pertama (a) Aktivitas antimikroba *Staphylococcus aureus*; (b) Aktivitas antimikroba *Escherichia coli*.



Gambar 3. Aktivitas antimikroba inkubasi hari ketiga (a) Aktivitas antimikroba *Staphylococcus aureus*; (b) Aktivitas antimikroba *Escherichia coli*

Keberhasilan aktivitas antimikroba dapat dilihat pada data pengukuran zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Gambar 4, bakteri uji *Escherichia coli* sampel non ragi pengenceran 10^{-5} (Non Ragi 5) memiliki aktivitas sebesar 2,5 mm, sampel non ragi pengenceran 10^{-7} (Non Ragi 7) sebesar 3,5 mm, sampel dengan penambahan ragi dan pengenceran 10^{-5} (Ragi 5) memiliki diameter hambat 4,93 mm, sampel dengan penambahan ragi dan pengenceran 10^{-7} (Ragi 7) sebesar 3,86 mm. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dengan sampel non ragi dengan pengenceran 10^{-5} (Non Ragi 5) memiliki diameter hambat sebesar 3,13 mm, sampel non ragi dan pengenceran 10^{-7} (Non Ragi 7) sebesar 1,37 mm, sampel dengan ragi dan pengenceran 10^{-5} (Ragi 5) sebesar 3,77 mm dan sampel dengan ragi dan pengenceran 10^{-7} (Ragi 7) sebesar 4,33 mm. Aktivitas penghambatan terbesar ada pada *Escherichia coli* ada pada isolat dengan penambahan ragi dan pengenceran 10^{-5} dengan nilai rata-rata $4,93 \pm 1,65$ mm. Aktivitas penghambatan terbesar ada pada *Staphylococcus aureus* ada pada isolat dengan penambahan ragi dan pengenceran 10^{-7} dengan nilai rata-rata $4,33 \pm 2,02$ mm.



Gambar 4. Perbandingan zona hambat isolat bakteri dengan pengujian pada *E. coli* dan *S. Aureus*; sampel non ragi pengenceran 10^{-5} (Non Ragi 5); sampel non ragi pengenceran 10^{-7} (Non Ragi 7); sampel dengan *starter* ragi dan pengenceran 10^{-5} (Ragi 5); sampel dengan *starter* ragi dan pengenceran 10^{-7} (Ragi 7)

Bakteri uji disuspensikan ke dalam dua mL larutan NaCl 0,9% untuk memperoleh tingkat kekeruhan larutan standar *McFarland*. Standar *McFarland* menunjukkan konsentrasi bakteri per mili meter yang dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu persatu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Bakteri uji diambil 1 ose kemudian dilarutkan kedalam 2 mL NaCl 0,9%, diambil 25 μ L dari suspensi dan dicampurkan dengan media *Nutrient Agar* (NA) yang masih cair dengan metode *pour plate*. Kertas cakram yang sudah disiapkan direndam dalam MRS *Broth* yang berisi BAL selama 25 menit (Ismail and Yulvizar, 2017).

Pengamatan terbentuknya zona bening dapat dilihat setelah melewati proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Fachrial, 2018). Dapat dilihat pada gambar 2, pada hari pertama setelah inkubasi 24 jam aktivitas antimikroba secara visual (diameter zona bening) pada sampel *Escherichia coli* memiliki aktivitas sedikit lebih besar dalam penghambatan mikroba dibandingkan *Staphylococcus aureus*. Setelah proses penyimpanan selama 2 hari ditemukan reaksi yang berbeda dapat dilihat pada gambar 3, muncul kekeruhan pada daerah sekitar cakram maupun pada zona bening, hal ini menandakan adanya pertumbuhan BAL yang berlimpah (Kiti et al., 2019). Namun pada sampel *Escherichia coli* reaksi yang dihasilkan lebih teratur.

Katalase merupakan suatu enzim yang mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Hidrogen peroksida terbentuk ketika proses aerob sehingga mikroorganisme yang tumbuh dapat menguraikan zat toksik. Bakteri anaerob tidak obligat tidak memproduksi enzim karena tidak memerlukan enzim pada proses. Apabila bakteri katalase positif maka menghasilkan gelembung oksigen karena memecah H_2O_2 oleh enzim katalase yang dihasilkan bakteri itu sendiri (Helgesen et al., 2017).

Hasil uji katalase digunakan sebagai parameter awal menentukan reaksi dari bakteri yang diduga BAL pada fermentasi air cucian beras. Karakterisasi biokimia pada penelitian ini meliputi uji katalase, berdasarkan uji katalase pada semua isolat menunjukkan karakteristik negatif dengan tidak terbentuknya gelembung gas, seperti Gambar 5, dikarenakan BAL tidak menghasilkan enzim katalase yang dapat mencegah memecah hidrogen peroksida (Susilawati, 2016). Kultur yang digunakan yang berumur 24 jam, apabila lebih dari 24 jam efektivitas bakteri tersebut menurun. Ketika uji katalase dinyatakan negatif, maka menunjukkan hasil bakteri tersebut gram positif karena hanya isolat yang menunjukkan gram positif bila hasil uji katalase negatif.



Gambar 5. Hasil uji katalase

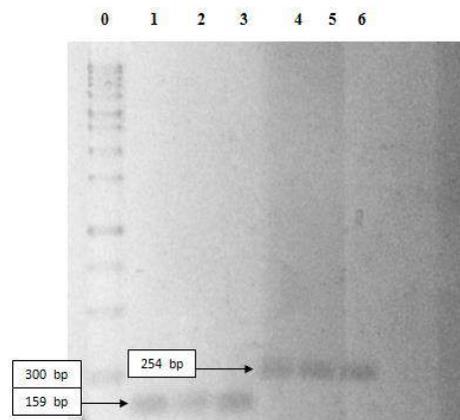
Primer yang digunakan untuk identifikasi *Lactobacillus casei* adalah *forward* 5'-GCATTAAGCATTCCGCCTGG-3' dan *reverse* 5'-TCATAAGGGTTGCGCTCGTT-3' dengan panjang produk 254 pb. Primer untuk mengidentifikasi *Lactobacillus rhamnosus* dengan *forward* 5'CGTAGGTGGCAAGCGTTATC-3' dan *reverse* 5'-TCACCGCTACACATGGAGTT-3', panjang produk 159 pb. Dalam pencarian primer yang sesuai perlu memperhatikan persentase GC karena merupakan kandungan jumlah basa G (guanin) dan C (sitosin) yang dapat mempengaruhi T_m suatu primer, selain itu persentase GC dapat mempengaruhi ikatan antar untai pada DNA. Persentase GC yang ditemukan masih memasuki rentang yakni sebesar 45%-55%, sedangkan persentase GC yang baik berkisar antara 40-60% (Sasmitha et al., 2018).

Kandungan GC yang tinggi akan mempersulit pemisahan rantai untai ganda pada primer dan template. Faktor kedua adalah T_m , yakni suhu dimana 50% untai ganda DNA telah terpisah,

nilai T_m (*Temperature melting*) yang direkomendasikan berkisar antara 50-65°C (Sacchi et al., 2002).

T_m pada primer *Lactobacillus casei* maupun *Lactobacillus rhamnosus* menunjukkan angka 59-60% sehingga masih masuk dalam rentang. Faktor lain yang perlu diperhitungkan lainnya adalah nilai SC (*Self-Complementary*) dan PC (*Pair-Complementary*), nilai SC dan PC yang semakin tinggi dapat menyebabkan struktur hairpin yang stabil hanya dengan 4 pasangan basa GC pada ujung maupun bagian tengah primer. Primer harusnya berisi kurang dari 4 basa komplementer terutama pada ujung 3'. PC akan berdampak pada struktur dimer (Eling KS et al., 2014). *Cross dimer* menjadikan pembacaan menjadi tidak akurat. Nilai SC dan PC yang baik adalah dibawah 5.00.

Hasil pengamatan pita muncul dengan baik pada waktu inkubasi selama 1 jam, menggunakan tegangan 100 volt selama 50 menit, konsentrasi agarosa 2% dan dengan suhu penempelan (*Temperature annealing*) 57°C. Hasil amplikon memiliki tingkat ketebalan yang sama, *Lactobacillus rhamnosus* berada pada *product length* 159 bp sesuai klasifikasi pada ncbi, sedangkan *Lactobacillus casei* berada pada *product length* 254 bp. Namun pada percobaan kedua hasil belum spesifik dikarenakan *band/pita* yang terbentuk keduanya yang seharusnya hanya satu diantaranya atau bahkan salah satu *band/pita* yang terbentuk adalah spesies lain. Perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* dan membandingkan primer yang digunakan untuk melihat kebenaran pernyataan dari percobaan kedua agar hasil lebih spesifik walaupun sudah terlihat bahwa pita yang terbentuk menunjukkan keberadaan BAL *Lactobacillus* golongan *casei* pada fermentasi air cucian beras. Hasil deteksi primer spesifik dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Deteksi primer spesifik, lane 0. *Lactobacillus* identification ladder; lane 1, 2, dan 3 sampel *L.rhamnosus* sampel; lane 4, 5, 6 sampel *L.casei*

KESIMPULAN

Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari fermentasi air cucian beras berdasarkan hasil karakteristik isolat yang terbentuk telah sesuai dengan literatur yakni isolat membentuk koloni bulat dan bewarna putih kekuningan. Aktivitas antimikroba pada isolat lebih dominan pada bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus*, sehingga diyakini bakteriosin dalam kandungan BAL yang berperan. BAL yang diperoleh tidak memproduksi enzim katalase karena tidak terbentuk gelembung pada seluruh sampel isolate. Hasil elektroforesis menunjukkan terbentuknya pita pada kisaran 300 bp yang artinya kedua primer terdeteksi dikarenakan *Lactobacillus casei* berada pada 254 bp sedangkan *Lactobacillus rhamnosus* berada pada 159 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Ma Chung yang telah memberikan dukungan dana dalam terselenggaranya penelitian ini. Terima kasih juga kepada Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung, dimana penelitian ini dapat dilakukan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bulut, C., Gunes, H., Okuklu, B., Harsa, S., Kilic, S., Coban, H. S., & Yenidunya, A. F. (2005). Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 19–24.
- Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K., & Duncan, J. M. (2001). Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107(4), 387–398.
- Eling KS, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis 2014*, 93–102.
- Fachrial, E. (2018). Aktivitas antimikroba dan identifikasi molekuler bakteri asam laktat yang diisolasi dari “ Pliek U ”, makanan fermentasi tradisional asal Aceh , Indonesia. *Seminar Nasional Universitas Pasir Pengaraian*, ISBN: 978-602-52720-0-4, 82–87.
- Handayani, I., & Sustriawan, B. (2012). Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus plantarum* untuk penurunan kolesterol pada minuman probiotik okara. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*, 12(Juni), 56–64.
- Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2017). Increased catalase activity — A possible resistance mechanism in hydrogen peroxide resistant salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Aquaculture*, 468, 135–140.
- Ismail, Y. S., & Yulvizar, C. (2017). Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Bioleuser*, 1(2), 45–53.
- Kiti, A. A., Jamilah, I., & Rusmarilin, H. (2019). Aktivitas antimikroba isolat bakteri asam laktat

- yang diisolasi dari pangan pliek u terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan Khamir *Candida albicans* secara in vitro. *Journal of Healthcare Technology and Medicine*, 4(1), 118.
- Poeker, S. A., Geirnaert, A., Berchtold, L., Greppi, A., Krych, L., Steinert, R. E., De Wouters, T., & Lacroix, C. (2018). Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.
- Putra, T. P. (2015). *Isolasi, karakterisasi dan identifikasi molekuler bakteri asam laktat dari limbah pembuatan dangke asal kabupaten Enrekang*.
- Reuter, G., Klein, G., & Goldberg, M. (2002). Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Research International*, 35(2–3), 117–124.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S., & Popovic, T. (2002). Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(10), 1117–1123.
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., & Yowani, S. C. (2018). Desain DNA primer secara in silico sebagai pendeteksi mutasi gen *gyrA* *Mycrobacterium tuberculosis* untuk metode polymerase chain reaction. *CAKRA KIMIA (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 6(1), 63–69.
- Singh, R. D., Banerjee, J., & Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 19–30.
- Suciati, P., Tjahjaningsih, W., Dewi Masithah, E., & Pramono, H. (2019). aktivitas enzimatis isolat bakteri asam laktat dari saluran pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla spp.*) sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 8(2), 94.
- Susilawati, S. (2016). Isolasi dan karakterisasi bakteri Asam Laktat (Bal) dari air cucian beras. In *Universitas Riau*.
- Widowati, S., & Misgiyarta. (2002). Efektifitas Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam pembuatan produk fermentasi berbasis protein / susu nabati. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan Dan Bioteknologi Tanaman*, 360–373.
- Wu, J., Zhang, Y., Ye, L., & Wang, C. (2021). The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review. *Carbohydrate Polymers*, 253(October 2020), 117308.