

ARTIKEL

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULAR 16S rRNA PROBIOTIK DARI MINUMAN FERMENTASI KULIT BIJI KOPI SEBAGAI ANTI INFEKSI PENYAKIT TROPIS

[*Isolation and Molecular Characterization of 16S rRNA Probiotics from Fermented Coffee Bean Skin Drink as an Antimicrobial Agent Against Tropical Diseases*]

Sharfina Maulidayanti^{1*}, Futri Andini¹, Ing Mayfa Br Situmorang², Asbar Tanjung¹, Isra Jannatin Ningrum³

¹Departemen Teknologi Laboratorium Medis, Stikes Prima Indonesia

²Program Studi Farmasi, Stikes Medistra Indonesia

³Departemen Farmasi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

ABSTRAK

Penyakit infeksi tropis yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* menjadi tantangan besar dalam dunia kesehatan, terutama dengan meningkatnya kasus resistensi antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi probiotik dari minuman fermentasi kulit biji kopi (*Coffea* sp.) sebagai alternatif alami untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Isolasi dan karakterisasi fenotipik dilakukan terhadap bakteri asam laktat (BAL), meliputi pengamatan morfologi koloni, pewarnaan Gram, uji katalase, dan uji motilitas. Selain itu, dilakukan uji ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu, serta uji daya hambat terhadap *E. coli* dan *S. typhi*. Hasil menunjukkan bahwa isolat BAL yang diperoleh memiliki ciri khas, yaitu morfologi koloni bulat putih, bersifat Gram positif, non-motil, dan katalase negatif. Isolat juga mampu bertahan pada kondisi ekstrem, yakni pH 3 hingga 7 serta garam empedu 3%. Uji daya hambat menunjukkan kemampuan antibakteri yang baik, dengan zona hambat terhadap *E. coli* sebesar 27,25 mm dan terhadap *S. typhi* sebesar 22,5 mm, yang termasuk dalam kategori susceptible hingga intermediate. Analisis genotip melalui sekuensing gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat memiliki persentase homologi sebesar 98,7% dengan *Lactocaseibacillus rhamnosus*, mengidentifikasikannya sebagai spesies tersebut. Dengan demikian, *Lactocaseibacillus rhamnosus* dari fermentasi kulit biji kopi menunjukkan potensi sebagai kandidat probiotik alami, yang dapat digunakan dalam pengendalian infeksi bakteri tropis seperti *E. coli* enteropatogenik dan *S. typhi*.

Kata kunci: probiotik, kulit biji kopi, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, penyakit tropis

ABSTRACT

Tropical infectious diseases caused by *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* pose significant challenges to global health, particularly due to the rising incidence of antibiotic resistance. This study aimed to explore the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from coffee husk fermentation (*Coffea* sp.) as a natural alternative to inhibit the growth of these pathogenic bacteria. Phenotypic characterization and isolation of lactic acid bacteria (LAB) were conducted, including colony morphology observation, Gram staining, catalase test, and motility assay. Additionally, tolerance tests to low pH and bile salts were performed, alongside antibacterial activity assessments against *E. coli* and *S. typhi*. The results demonstrated that the isolated LAB exhibited distinct characteristics, including white, round colony morphology, Gram-positive staining, non-motility, and catalase negativity. The isolate was capable of surviving under extreme conditions, tolerating pH values ranging from 3 to 7 and 3% bile salt concentration. Antibacterial assays revealed significant inhibition zones measuring 27.25 mm against *E. coli* and 22.5 mm against *S. typhi*, categorized as susceptible to intermediate, respectively. Genotypic analysis via 16S rRNA gene sequencing revealed a 98.7% homology with *Lactocaseibacillus rhamnosus*, confirming the isolate's species identity. Therefore, *Lactocaseibacillus rhamnosus* derived from fermented coffee bean skins demonstrates promising potential as a natural probiotic candidate for controlling tropical bacterial infections such as enteropathogenic *E. coli* and *S. typhi*.

Keywords: probiotic, coffee husk, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, tropical diseases

PENDAHULUAN

Penyakit tropis adalah penyakit yang umumnya ditemukan di daerah tropis. Penyakit-penyakit ini sering dikaitkan dengan kondisi lingkungan, keberadaan vektor, serta faktor sosial dan ekonomi. Penyakit tropis yang utama adalah infeksi yang disebabkan oleh parasit, bakteri, virus, dan protozoa. Beberapa bakteri penyebab penyakit tropis yang sering ditemukan adalah *Escherichia coli*, yang merupakan flora normal dalam tubuh manusia yang dapat menyebabkan diare jika jumlah bakteri tersebut meningkat (Afum *et al.*, 2022) dan *Salmonella typhi*, yang dapat menyebabkan demam tifoid (Gunawan *et al.*, 2022). Pengobatan infeksi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dapat dilakukan melalui penggunaan antibiotik, namun penggunaan antibiotik akan berdampak pada resistensi antibiotik (Mayaranti *et al.*, 2021). Oleh karena itu, perlu dicari alternatif untuk kasus infeksi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*, salah satunya dengan penggunaan probiotik yang terbuat dari bahan alami.

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan keanekaragaman hayati yang memiliki ribuan spesies tanaman yang perlu dilestarikan dan dimanfaatkan dengan baik, salah satunya adalah tanaman kopi. Tanaman kopi (*Coffea* sp.) merupakan salah satu jenis tanaman yang tumbuh dengan baik di Indonesia. Kopi merupakan jenis tanaman pohon yang termasuk ke dalam famili Rubiaceae dan genus *Coffea* (Tawali *et al.*, 2018). Bagian dari tanaman kopi yang dapat dimanfaatkan sebagai agen antibakteri adalah kulit biji kopi (Ishimora *et al.*, 2023) yang dapat dimanfaatkan sebagai minuman fermentasi berpotensi sebagai sumber probiotik alami (Mathur *et al.*, 2020).

Probiotik merupakan mikroba hidup yang dapat memberikan efek positif bagi manusia dan juga memperbaiki keseimbangan mikroflora di dalam usus, salah satunya adalah bakteri asam laktat (BAL) yang merupakan bakteri penghasil asam laktat sebagai produk metabolisme karbohidrat (Mathur *et al.*, 2020). Bakteri asam laktat (BAL) dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai produk yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia. Beberapa penelitian telah berhasil mengeksplorasi potensi produk makanan tradisional dan modern sebagai anti-infektif atau antibakteri, termasuk (Maulidayanti *et al.*, 2019) makanan fermentasi Inasua dari Maluku Tengah yang menghasilkan isolat bakteriosin *Lactobacillus rhamnosus* N13 yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella* sp. Ada pula penelitian lain yang berhasil mengisolasi LAB dari berbagai sumber termasuk makanan fermentasi (acar, tape singkong & pasta udang) (Priadi *et al.*, 2020), ekstrak ubi jalar ungu (Tasminto *et al.*, 2021), ikan bilih (Prima & Rusfidra, 2021), susu kuda Sumba (Detha *et al.*, 2019). Spesies LAB yang terisolasi termasuk *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum*, dan *Lactobacillus plantarum*. Manfaat metabolit yang

diproduksi oleh BAL telah terbukti menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian oleh Rihibiha (2022) juga berhasil mengisolasi BAL dari minuman ampas kopi fermentasi dengan spesies BAL seperti *Gluconacetobacter* dan *Lactobacillus*.

Namun hingga saat ini, belum banyak laporan ilmiah yang secara spesifik mengeksplorasi potensi isolasi BAL dari minuman fermentasi berbahan dasar kulit biji kopi, terutama sebagai sumber probiotik potensial untuk pengendalian penyakit infeksi tropis. Kebaruan (novelty) dari penelitian ini terletak pada penggunaan limbah kulit biji kopi yang selama ini belum banyak dimanfaatkan sebagai substrat fermentasi untuk mengisolasi bakteri probiotik, sekaligus mengkaraktirasi secara molekular menggunakan pendekatan gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi spesies dengan akurasi tinggi. Karakterisasi molekular menggunakan sekuensing gen 16S rRNA memungkinkan identifikasi spesifik hingga tingkat genus atau spesies, sehingga memberikan kepastian taksonomi dari isolat BAL yang diperoleh. Setelah spesies teridentifikasi, informasi ini menjadi dasar untuk mengevaluasi literatur terkait kemampuan antibakteri atau aktivitas biologis spesies tersebut terhadap patogen tropis seperti *E. coli* dan *S. typhi*. Dengan demikian, hubungan antara hasil karakterisasi molekular dan potensi anti-infeksi tropis diperkuat melalui pendekatan literatur berbasis spesies, serta uji empiris (uji antibakteri in vitro) terhadap patogen tropis.

Berdasarkan deskripsi di atas, perlu dilakukan penelitian terkait identifikasi genotip bakteri dari minuman fermentasi kulit biji kopi sebagai sumber probiotik potensial dan sebagai agen pengendali penyakit menular tropis yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pencarian alternatif antibakteri berbasis hayati yang ramah lingkungan dan mendukung pemanfaatan limbah pertanian seperti kulit biji kopi.

BAHAN DAN METODE

Prosedur Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat gelas seperti tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, pipet, dan batang pengaduk disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Bahan cair seperti akuades juga disterilisasi dengan cara yang sama untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan.

Pembuatan Media

Media de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar)

Sebanyak 6,2 g MRS agar dilarutkan dalam 100 mL akuades, dipanaskan hingga homogen, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah didinginkan hingga $\pm 50^\circ\text{C}$, dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing 15 mL dan dibiarkan memadat.

Media de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth)

Sebanyak 5,2 g MRS broth dilarutkan dalam 100 mL akuades dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media ini digunakan untuk fermentasi awal bakteri asam laktat.

Media Nutrient Agar (NA)

Sebanyak 2,8 g NA dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Sebanyak 19 g MHA dilarutkan dalam 500 mL akuades, kemudian dipanaskan dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan sebanyak 25 mL ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Koloni murni *E. coli* dan *S. typhi* dari media NA diinokulasi ke dalam 5 mL NaCl fisiologis steril. Suspensi distandarisasi sesuai standar McFarland 0,5 (sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) untuk memastikan kepadatan bakteri seragam saat uji antibakteri.

Isolasi BAL dari Minuman Fermentasi Kulit Biji Kopi

Sampel minuman fermentasi kulit biji kopi sebanyak 0,3 mL diinokulasikan ke dalam 3 mL MRS broth, dihomogenkan dengan vortex, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, 100 μ L kultur ditanam pada MRS agar yang ditambahkan 1% CaCO₃ untuk mendeteksi produksi asam laktat (ditandai zona bening di sekitar koloni). Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu 37°C. Isolat yang menunjukkan zona bening dipilih untuk karakterisasi lebih lanjut.

Karakterisasi Fenotip

Morfologi Koloni

Pengamatan makroskopik terhadap bentuk, warna, elevasi, dan margin koloni dilakukan setelah inkubasi pada MRS agar. Zona bening menunjukkan kemampuan menghasilkan asam.

Pewarnaan Gram

Dilakukan sesuai prosedur standar Gram dengan kristal violet, iodine, alkohol 95%, dan safranin. Pewarnaan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak imersi.

Uji Biokimia

Uji Katalase: Dua tetes H₂O₂ 3% ditambahkan pada koloni bakteri. Tidak munculnya gelembung menandakan isolat adalah katalase-negatif, sesuai karakteristik BAL. Uji Motilitas: Inokulasi pada media semisolid SIM, inkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Bakteri non-motil hanya tumbuh di area tusukan.

Uji Probiotik

Uji Ketahanan pH

Sebanyak 1 mL kultur BAL diinokulasikan ke dalam MRS broth dengan pH yang disesuaikan (3, 4, 5, dan 7) menggunakan HCl. Inkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan ditandai dengan kekeruhan medium.

Uji Ketahanan Garam Empedu

Sebanyak 0,1 mL kultur BAL ditambahkan ke 2 mL MRS broth dengan 3% NaCl, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diinokulasikan ke MRS agar untuk melihat pertumbuhan lanjutan.

Uji Potensi Anti-infeksi secara *In Vitro*

Uji daya hambat BAL terhadap *E. coli* dan *S. typhi* dilakukan menggunakan metode sumuran. Kultur BAL selama 24 jam disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan (ekstrak kasar metabolit). MHA diinokulasi dengan bakteri uji yang distandarisasi (McFarland 0,5). Sumuran dibuat (diameter ± 5 mm), diisi 50 μ L ekstrak BAL, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Kontrol positif menggunakan ciprofloxacin 5 mg/mL. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong digital dan dibandingkan terhadap kontrol. Catatan penting: Pengujian ini dilakukan secara *in vitro*, bukan hanya melalui prediksi *in silico*, sehingga dapat memberikan bukti empiris atas potensi antibakteri isolat BAL terhadap patogen tropis.

Karakterisasi Genotip menggunakan 16S rRNA dan Analisis Filogenetik

Ekstraksi DNA

DNA diisolasi dari isolat BAL yang telah dikarakterisasi fenotipenya menggunakan kit komersial (misalnya GeneJET Genomic DNA Purification Kit) atau metode boiling (jika sumber terbatas).

PCR Amplifikasi

PCR dilakukan menggunakan primer universal 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' dan 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. Kondisi PCR yang digunakan yaitu denaturasi awal: 95°C selama 3 menit, 35 siklus, denaturasi: 95°C selama 30 detik; annealing: 55°C selama 30 detik; elongasi: 72°C selama 90 detik; elongasi akhir: 72°C selama 7 menit. Hasil PCR dikonfirmasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dengan pencelupan EtBr atau GelRed dan visualisasi dengan UV transilluminator.

Sequencing dan Analisis Filogenetik

Produk PCR dikirim untuk sequencing. Hasil sekuens disusun dan dianalisis menggunakan program seperti MEGA X untuk penyusunan pohon filogenetik (menggunakan metode Neighbor-Joining atau Maximum Likelihood). Identifikasi spesies dilakukan dengan BLASTN terhadap database NCBI GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Pohon filogenetik disusun untuk menentukan kekerabatan genetik isolat BAL terhadap spesies-spesies lain, dan digunakan sebagai dasar dalam penentuan potensi aplikatif BAL terhadap patogen tropis yang relevan.

HASIL

Hasil Isolasi BAL dari Fermentasi Kulit Biji Kopi

Minuman fermentasi kulit biji kopi (*Coffea* sp.) yang berasal dari Takengon, Provinsi Aceh, digunakan sebagai sumber isolat bakteri asam laktat (BAL). Pertumbuhan BAL ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada media MRS agar yang ditambahkan 1% CaCO₃, yang mengindikasikan produksi asam laktat oleh isolat.



Gambar 1. Pertumbuhan koloni BAL di tandai dengan adanya zona bening disekitar koloni (*The growth of the BAL colony is marked by the presence of clear zones around the colony*).

Hasil pengamatan secara makroskopis menunjukkan bahwa isolate memiliki bentuk koloni bulat, warna koloni putih, elevasi cembung dengan tepian koloni yang utuh. Media MRS yang digunakan untuk menyeleksi bakteri yang menghasilkan asam laktat sehingga zona bening yang terbentuk pada media MRS disebabkan karena adanya reaksi asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dengan senyawa yang terdapat pada media tersebut (Falakh & Astri, 2022). Pada umumnya senyawa kalsium karbonat (CaCO₃) untuk isolasi BAL karena kemampuannya bereaksi dengan asam laktat dan membentuk senyawa baru yaitu kalsium laktat (C₆H₁₀CaO₆) sehingga menimbulkan warna jernih pada media (Falakh & Astri, 2022). Hasil pengamatan morfologi koloni terhadap isolat tersebut terdapat beragam karakter BAL dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Makroskopis pada Isolat BAL (*Results of Macroscopic Observations on BAL Isolate*).

Isolat (<i>Isolate</i>)	Bentuk (<i>Shape</i>)	Warna (<i>Color</i>)	Tepi (<i>Edge</i>)	Elevasi (<i>Elevation</i>)
BAL KBK	Bulat (<i>Round</i>)	Putih (<i>White</i>)	<i>Entire</i>	Cembung (<i>Convex</i>)

Fenotipik

Pewarnaan Gram

Bakteri asam laktat diidentifikasi secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop cahaya untuk melihat bentuk sel bakteri. Identifikasi ini dilakukan dengan pewarnaan gram. Hasil pengamatan karakterisasi mikroskopis dengan teknik pewarnaan gram isolat KBK menunjukkan morfologi koloni.



Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram pada Isolat BAL dari Minuman Fermentasi Kulit Biji Kopi (*Results of Gram Staining on BAL Isolate from Fermented Coffee Bean Skin Drink*)

Pewarnaan Gram (Gambar 2) menunjukkan bahwa isolat merupakan basil Gram positif, ditandai dengan warna ungu. Ini sesuai dengan ciri khas BAL dan mendukung hasil Kurnia *et al.* (2020).

Uji Katalase (Gambar 3) menunjukkan hasil negatif, mengonfirmasi bahwa isolat tidak menghasilkan enzim katalase, sesuai dengan karakteristik BAL yang anaerob fakultatif dan menghasilkan enzim peroksidase (Ismail *et al.*, 2023). Uji Motilitas menunjukkan isolat bersifat non-motil, yang konsisten dengan BAL pada umumnya (Detha *et al.*, 2019).



Gambar 2. Hasil Uji Katalase pada Isolat BAL dari Fermentasi Kulit Biji Kopi (*Results of Catalase Test on BAL Isolate from Fermentation of Coffee Bean Husks*).

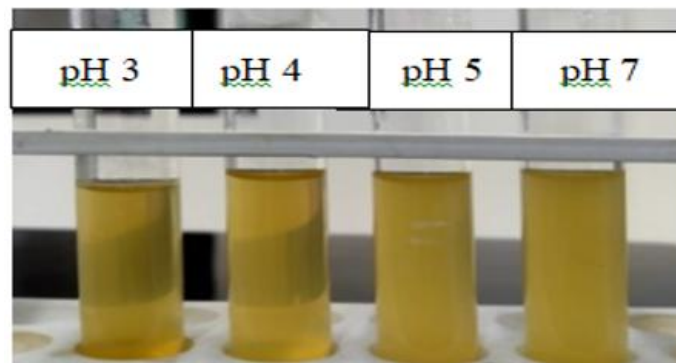
Hasil Uji Ketahanan pH

Pada uji ketahanan pH, isolat bakteri asam laktat yang diuji menunjukkan ketahanan terhadap pH rendah. Kemampuan isolat bakteri asam laktat terhadap variasi pH ditandai dengan kekeruhan setelah masa inkubasi pada media dengan variasi pH (3, 4, 5, dan 7).

Hasil uji ketahanan pH BAL pada media MRSB dengan variasi pH 3, 4, 5 dan 7 (Gambar 5) menunjukkan bahwa kedua isolat mampu bertahan hidup pada kondisi tersebut. Hasil ini dapat dilihat dengan adanya kekeruhan yang menyatakan bahwa BAL tumbuh pada pH 4. Hasil ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Mawardika *et al.*, 2023) bahwa BAL dapat tumbuh pada pH 5. Dan hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Najah *et al.*, 2023) yang menemukan bahwa BAL tumbuh pada pH 7 sebagai kontrol.



Gambar 3. Hasil Uji Motilitas pada Isolat BAL dari Minuman Fermentasi Kulit Biji Kopi (*Motility Test Results on BAL Isolate from Coffee Bean Skin Fermented Beverage*).

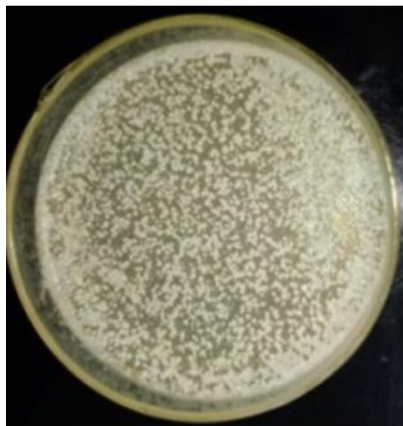


Gambar 4. Hasil Uji Ketahanan pH pada Isolat BAL dari Minuman Fermentasi Kulit Biji Kopi (*pH Resistance Test Results on BAL Isolate from Coffee Bean Skin Fermented Beverage*).

BAL dapat tumbuh pada pH rendah karena bakteri ini memiliki enzim protease yaitu aminopeptidase yang dapat mempengaruhi adaptasi dan pertumbuhan BAL pada kondisi asam. Enzim protease dibutuhkan oleh BAL untuk pertumbuhannya dalam menghasilkan asam seperti pada proses fermentasi (Sitorus *et al.*, 2019). Pada pH rendah enzim juga berperan dalam mempengaruhi pertumbuhan BAL. Kondisi saluran pencernaan sangat erat kaitannya dengan pH yang berbeda-beda, salah satu yang menjadi faktor utama dalam menentukan kadar pH pada saluran pencernaan adalah keasaman asam lambung. Keasaman lambung berfungsi sebagai pintu gerbang utama seleksi mikroba sebelum masuk ke dalam usus (Julianto *et al.*, 2023).

Uji Ketahanan Garam Empedu

Hasil uji ketahanan bakteri kandidat probiotik terhadap kondisi asam dari kedua isolat probiotik menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu bertahan hidup pada kondisi garam empedu yang ditandai dengan pertumbuhan pada media MRSB yang ditambahkan dengan NaCl 3% kemudian ditumbuhkan pada media MRSA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (Gambar 6). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Sumardi *et al.*, 2021) yang menunjukkan bahwa BAL dapat tumbuh pada kondisi garam empedu 3%.



Gambar 5 Hasil Uji Ketahanan Garam Empedu pada Isolat BAL dari Minuman Fermentasi Kulit Biji Kopi (*Bile Salt Resistance Test Results on BAL Isolate from Coffee Bean Peel Fermented Beverage*).

BAL memerlukan tingkat ketahanan garam empedu karena mempengaruhi fungsi dalam saluran pencernaan, terutama saluran usus bagian atas di mana empedu dikeluarkan. Empedu adalah senyawa aktif permukaan yang juga memicu enzim lipolitik pankreas. Enzim ini berinteraksi dengan asam lemak pada membran sitoplasma bakteri, mengubah struktur membran dan permeabilitasnya yang dapat mempengaruhi ketahanannya terhadap gram empedu.

Uji Daya Hambat terhadap Bakteri yang Menyebabkan Penyakit Infeksi

Hasil uji pewarnaan gram pada isolat bakteri *Escherechia coli* didapatkan hasil pengamatan di bawah mikroskop adalah bakteri bertangkai pendek dan berwarna merah setelah dilakukan pewarnaan. Hasil uji daya hambat ekstrak kasar isolat BAL terhadap bakteri *Escherechia coli* menunjukkan bahwa isolat memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan yang ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk.

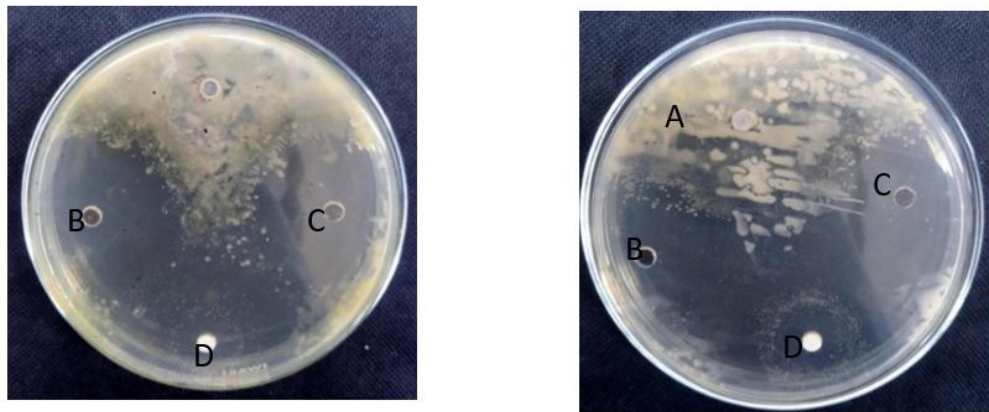
Hasil Uji Daya Hambat BAL Terhadap Bakteri *Escherechia coli*

Hasil uji daya hambat ekstrak kasar dari isolat BAL terhadap bakteri *Escherechia coli* menunjukkan kedua isolat memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk.

Tabel 2. Hasil uji potensi BAL fermentasi kulit biji kopi terhadap pertumbuhan bakteri *Escherechia coli* (Results of the Coffee Bean Husk Fermentation BAL Potential Test on the Growth of *Escherechia coli* Bacteria).

Kode (Code)	Diameter Zona Hambat (Inhibition Zone Diameter) (mm)		Rata-rata (mm)	Kategori (Category)
	1	2		
A	0,00	0,00	0,00	<i>Resisten</i>
B	27	19,5	23,25	<i>Intermediate</i>
C	28,5	27	27,75	<i>Susceptible</i>
D	32,5	30	31,25	<i>Susceptible</i>

Keterangan : Data diikuti dengan notasi huruf (A, B, C, D) untuk menunjukkan beda nyata disetiap perlakuan. Data yang diperoleh sudah dikurangi dengan diameter lubang sumuran (5mm). Data yang diperoleh berasal dari rata-rata 2 kali pengulangan (Remarks: The data are followed by letter notation (A, B, C, D) to show the real difference in each treatment. The data obtained has been reduced by the diameter of the well (5mm). The data obtained came from an average of 2 repetitions).

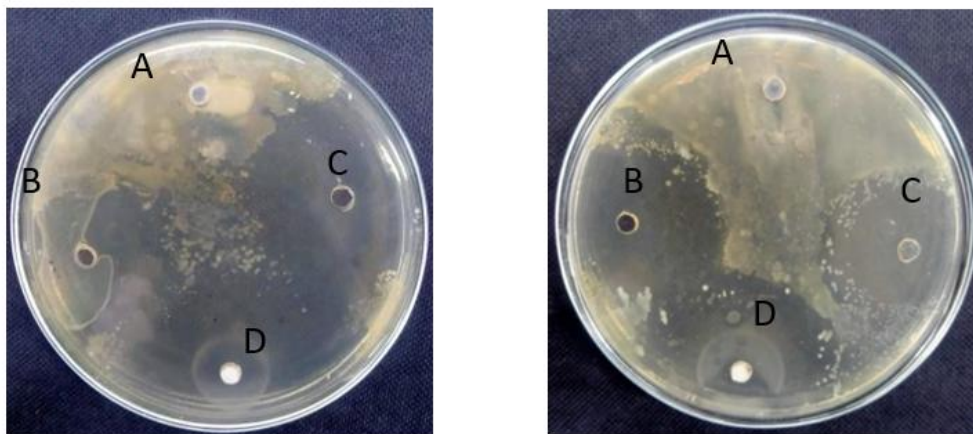


Gambar 7. Penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherechia coli* oleh isolat BAL dari fermentasi kulit biji kopi : (A) Perlakuan kontrol negatif; (B) Perlakuan isolat KBK ; (C) Perlakuan isolat KBK ; (D) Perlakuan kontrol positif (Ciprofloxacin) (Inhibition of the growth of *Escherechia coli* bacteria by BAL isolate from fermentation of coffee bean husks: (A) Negative control treatment; (B) Treatment of KBK isolation; (C) Treatment of KBK isolation; (D) Positive control treatment (Ciprofloxacin)). Dari kiri-kanan: Ulangan 1 dan 2 (From left-right: repetition 1 and 2)

Hasil uji daya hambat isolat ekstrak kasar dari isolat BAL yang berasal dari fermentasi kulit biji kopi diperoleh isolat dengan kode KBK dapat menghambat pertumbuhan *Escherechia coli* (Gambar 7). Isolat dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri *Escherechia coli*. Isolat dengan kode KBK memiliki daya hambat sebesar 27,25 mm dikategorikan sebagai *intermediate* terlihat pada Tabel 2.

Hasil Uji Daya Hambat BAL Terhadap Bakteri *Salmonella typhi*

uji daya hambat ekstrak kasar dari isolat BAL terhadap bakteri *Salmonella typhi* menunjukkan kedua isolat memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk.



Gambar 8. Penghambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* oleh isolat BAL dari fermentasi kulit biji kopi: (A) Perlakuan kontrol negatif; (B) Perlakuan isolat KBK ; (C) Perlakuan isolat KBK ; (D) Perlakuan kontrol positif (*Ciprofloxacin*) (*Inhibition of the growth of Salmonella typhi bacteria by BAL isolate from fermentation of coffee bean husks: (A) Negative control treatment; (B) Treatment of KBK isolation; (C) Treatment of KBK isolation; (D) Positive control treatment (Ciprofloxacin)*). Dari kiri-kanan: Ulangan 1 dan 2 (*From left-right: repetition 1 and 2*)

Keterangan: Data diikuti dengan notasi huruf (A, B, C, D) untuk menunjukkan beda nyata disetiap perlakuan. Data yang diperoleh sudah dikurangi dengan diameter lubang sumuran (5mm). Data yang diperoleh berasal dari rata-rata 2 kali pengulangan (*Remarks: The data is followed by letter notation (A, B, C, D) to show the real difference in each treatment. The data obtained has been reduced by the diameter of the well (5mm). The data obtained came from an average of 2 repetitions*)

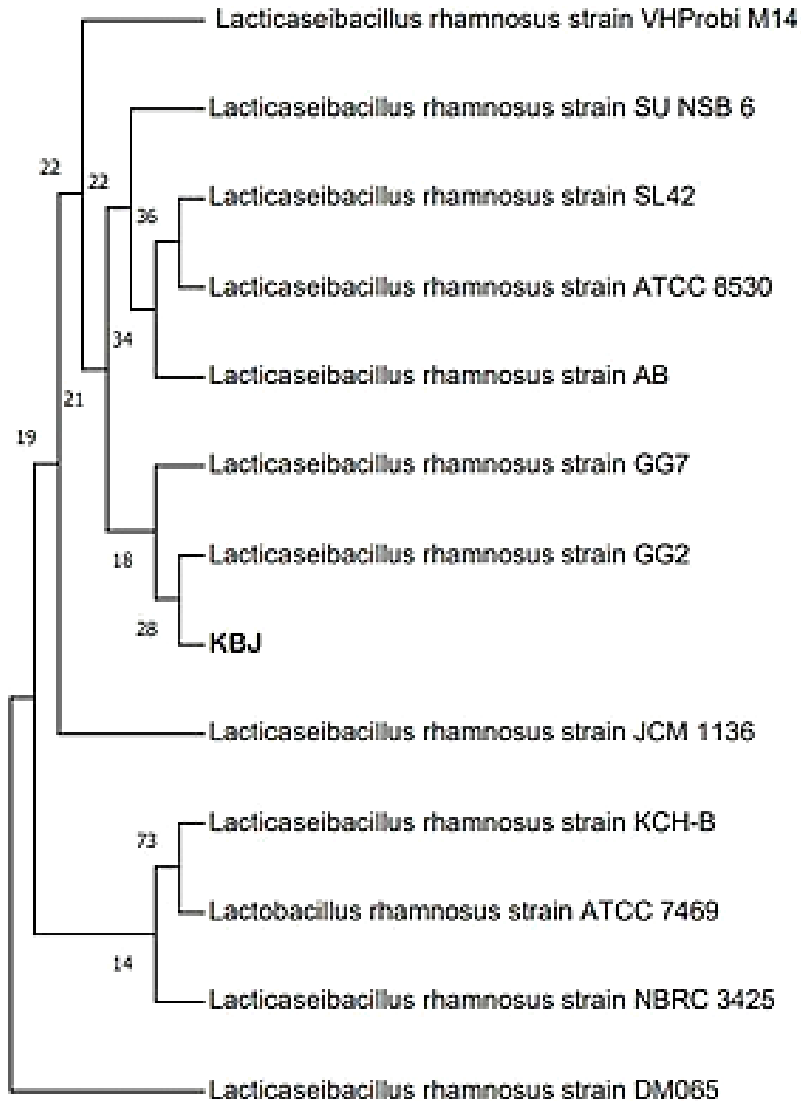
Hasil uji daya hambat isolat ekstrak kasar dari isolat BAL yang berasal dari fermentasi kulit biji kopi diperoleh isolat dengan kode KBK dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* (Gambar 8). Isolat dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Isolat dengan kode KBK sebesar 22,5 mm dikategorikan sebagai *intermediate* (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil uji potensi BAL fermentasi kulit biji kopi terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* (*Results of the Coffee Bean Husk Fermentation BAL Potential Test on the Growth of Salmonella typhi Bacteria*).

Kode (Code)	Diameter Zona Hambat (Inhibition Zone Diameter) (mm)		Rata-rata (mm)	Kategori (Category)
	1	2		
A	0	0	0	<i>Resisten</i>
B	28	30	29	<i>Intermediate</i>
C	20	25	22,5	<i>Intermediate</i>
D	33	30	31,5	<i>Susceptible</i>

Karakterisasi molekular

Berdasarkan hasil identifikasi urutan basa nukleotida fragmen gen 16S rRNA yang telah dicocokkan pada program BLASTn, diketahui bahwa gen 16S rRNA bakteri UBC-DTK-02 memiliki kesamaan lebih dari 98,7% dengan bakteri *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri hasil isolasi dari minuman fermentasi kulit biji kopi merupakan kelompok spesies *Lactocaseibacillus rhamnosus* yang termasuk salah satu jenis spesies bakteri asam laktat dan bersifat sebagai probiotik. Pohon filogenetik isolat bakteri minuman fermentasi kulit biji kopi (Gambar 9)



Gambar 9. Pohon Filogenetik isolat bakteri minuman fermentasi kulit biji kopi (*Tree Phylogenetics Bacterial Isolate Fermentation Drink Coffee Bean Skin*).

PEMBAHASAN

Data yang diperoleh dari hasil isolasi bakteri asam laktat (BAL) dari minuman fermentasi kulit biji kopi menunjukkan bahwa terdapat satu isolat yang diindikasikan dengan terbentuknya zona bening pada media MRSA dengan penambahan CaCO_3 1%. Zona bening ini muncul akibat reaksi antara asam organik yang diproduksi oleh BAL dengan senyawa kalsium karbonat dalam media, membentuk kalsium laktat ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$), yang menjernihkan area sekitar koloni (Falakh & Astri, 2022). Pengamatan makroskopis koloni BAL ditampilkan pada Gambar 1. Pengamatan mikroskopis melalui pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat BAL merupakan basil Gram positif. Warna ungu yang terbentuk menandakan peptidoglikan yang tebal pada dinding sel, sehingga mampu mempertahankan warna kristal violet meskipun telah melalui proses dekolorisasi (Kurnia *et al.*, 2020).

Uji katalase menunjukkan hasil negatif, mengindikasikan bahwa isolat tidak menghasilkan enzim katalase, namun dapat memproduksi enzim peroksidase yang mampu mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Jaya *et al.*, 2021). Hal ini mendukung identitas isolat sebagai BAL, karena secara umum BAL adalah bakteri katalase negatif. Uji motilitas (Gambar 4) pada media SIM juga menunjukkan bahwa isolat BAL bersifat non-motil. Pertumbuhan hanya terbatas pada daerah tusukan inokulum, yang berarti isolat tidak memiliki flagel sebagai alat gerak (Sya'binar *et al.*, 2017; Qadri, 2020). Pengujian ketahanan terhadap pH asam dilakukan pada media MRS dengan variasi pH 3, 4, 5, dan 7 (Gambar 5). Isolat menunjukkan pertumbuhan pada seluruh kondisi pH tersebut, termasuk pH ekstrem (pH 3), yang menjadi indikator penting kemampuan probiotik untuk bertahan hidup dalam lingkungan asam lambung (Suhaeni & Syakur, 2016). Ketahanan ini didukung oleh produksi enzim protease (aminopeptidase) yang memfasilitasi adaptasi terhadap lingkungan asam serta mempertahankan aktivitas metabolik (Sitorus *et al.*, 2019). Sebagaimana diketahui, keasaman lambung berfungsi sebagai penyaring mikroba patogen sebelum memasuki usus (Julianto *et al.*, 2023), sehingga ketahanan BAL terhadap pH rendah sangat penting dalam mekanisme kolonisasi usus oleh probiotik. Hasil uji daya hambat ekstrak kasar isolat BAL terhadap *E. coli* menunjukkan zona hambat sebesar 27,25 mm, yang termasuk dalam kategori *susceptible* (CLSI, 2020). Sementara terhadap *Salmonella typhi*, zona hambat yang dihasilkan sebesar 22,7 mm, dikategorikan sebagai *intermediate*. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat memiliki kemampuan antagonistik terhadap bakteri patogen enterik yang merupakan penyebab penyakit tropis. Aktivitas ini mengindikasikan bahwa BAL dari fermentasi kulit biji kopi memiliki kemampuan probiotik yang potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri enteropatogenik. *Lacticaseibacillus rhamnosus*, yang diidentifikasi sebagai spesies dominan dalam penelitian ini, diketahui memiliki mekanisme probiotik yang relevan terhadap patogen tropis seperti *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, dan *E. coli enteropatogenik (EPEC)*. Mekanisme tersebut mencakup: Produksi asam organik (laktat, asetat, propionat), yang menurunkan pH lingkungan dan menciptakan kondisi tidak optimal bagi pertumbuhan patogen. Produksi bakteriocin, senyawa antimikroba proteinik yang dapat menyebabkan lisis sel bakteri patogen melalui gangguan pada membran sitoplasma. Kompetisi adhesi dan nutrisi, di mana BAL bersaing dengan patogen untuk menempel pada epitel mukosa usus serta mengambil nutrisi, sehingga menghambat kolonisasi patogen. Stimulasi respon imun lokal, seperti peningkatan IgA sekretori dan modulasi sitokin, yang memperkuat pertahanan tubuh terhadap infeksi enterik.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *L. rhamnosus* dapat menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella typhi* secara *in vitro* (Maulidayanti *et al.*, 2019). Potensi ini juga didukung oleh studi Arihantana & Puspawati (2016) yang menunjukkan *L. rhamnosus A6* sebagai kandidat probiotik dengan tingkat adaptasi yang baik terhadap lingkungan gastrointestinal dan kapasitas produksi industri. Dengan mempertimbangkan berbagai mekanisme tersebut, isolat *L. rhamnosus* dari fermentasi kulit biji kopi dalam penelitian ini memiliki potensi aplikasi sebagai agen hayati pencegah atau pendukung pengobatan penyakit tropis berbasis infeksi bakteri usus, seperti diare akut akibat *E. coli enteropatogenik*, tifoid oleh *Salmonella typhi*, dan kolera oleh *Vibrio cholerae*.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi secara molekular bakteri asam laktat *Lactocaseibacillus rhamnosus* yang diisolasi dari minuman fermentasi kulit biji kopi. Identifikasi dilakukan melalui analisis gen 16S rRNA yang menunjukkan tingkat kemiripan (homologi) lebih dari 97% dengan spesies *L. rhamnosus*, serta didukung dengan pohon filogenetik. Isolat *L. rhamnosus* yang diperoleh menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*, yang dibuktikan melalui zona hambat pada uji antibakteri in vitro. Temuan ini mengindikasikan bahwa *L. rhamnosus* dari fermentasi kulit biji kopi memiliki potensi sebagai kandidat probiotik alami dengan kemampuan antimikroba yang menjanjikan, terutama terhadap patogen tropis seperti *Salmonella* dan *E. coli* enteropatogenik. Namun, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu dicatat. Uji potensi probiotik masih terbatas pada tahap in vitro, sehingga efektivitas dan keamanan *L. rhamnosus* sebagai probiotik belum dapat dikonfirmasi secara in vivo. Selain itu, belum dilakukan karakterisasi senyawa/metabolit bioaktif yang bertanggung jawab atas aktivitas antibakteri, seperti asam organik, bakteriocin, atau senyawa antimikroba lainnya. Aspek keamanan isolat, seperti uji resistensi antibiotik, uji hemolisis, atau deteksi gen toksin, juga belum dianalisis lebih lanjut. Oleh karena itu, studi lanjutan sangat diperlukan untuk mendukung penggunaan *L. rhamnosus* ini sebagai probiotik fungsional yang aman dan efektif, baik dalam bidang pangan fungsional maupun terapi infeksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian kepada Masyarakat (DRTPM) Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia atas dukungan pendanaan melalui skema Program Penelitian Dosen Pemula (PDP) Tahun Anggaran 2024. Dukungan ini sangat berarti dalam pelaksanaan dan penyelesaian penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh pihak yang telah membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung, dalam kegiatan penelitian ini.

KONTRIBUSI PENULIS

SMY: mengumpulkan data penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; IMY: Membuat konsep penelitian, merevisi naskah akhir; AB: Membuat konsep penelitian, membuat draf artikel ;FFA: mengumpulkan data penelitian; IJN : Membuat konsep penelitian, membuat draf artikel

REFERENSI

- Afum, T., Asandem, D. A., Asare, P., Asante-Poku, A., Mensah, G. I., Musah, A. B., Opare, D., Taniguchi, K., Guinko, N. M., Aphour, T., Arhin, D., Ishikawa, K., Matano, T., Mizutani, T., Asiedu-Bekoe, F., Kiyono, H., Anang, A. K., Koram, K. A., Yeboah-Manu, D. 2022. Diarrhea-Causing Bacteria and Their Antibiotic Resistance Patterns Among Diarrhea Patients From Ghana. *Frontiers in Microbiology*, 13, p.894319.
- Arihantana, N.M.I.H., Puspawati, N.N. 2016. *Identifikasi Fenotif Lactobacillus dari ASI dengan Kemampuan Memfermentasikan Gula-Gula Sederhana*. Senastek. Universitas Udayana, Denpasar.
- CLSI. 2020. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on Antimicrobial susceptibility testing: Background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology* 58, p.e01864-19.
- Detha, A., Datta, F. U., Beribe, E., Foeh, N., Ndaong, N. 2019. Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Sumba Mares Milk. *Jurnal Kajian Veteriner*, 7(1), pp.85–92.
- Falakh, M. F., Asri, M. T. 2022. Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) sebagai Antimikroba terhadap *Salmonella typhi*. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(3), pp.514-524.

- Gunawan, A., Rahman, I. A., Nurapandi, A., Chandra Maulana, N., Muhammadiyah, S. 2022. The Relationship between Personal Hygiene and the Incidence of Typhoid Fever in Adolescents in the Working Area of the Imbanagara Health Center, Ciamis Regency. *Healthcare Nursing Journal*, 4(2), pp.404–412.
- Ishimora, M. E., Prasetya, R. C., Susilawati, I. D. A. 2023. Kemampuan antibakteri ekstrak kulit buah kopi robusta dan arabika terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*: studi eksperimental. *Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students*, 7(3), pp.271–277.
- Ismail, I., Mubarak, F., Rasyak, R. I., Rusli, R., Fitriana, F., Mashar, H. M. 2023. Isolasi dan Uji Aktivitas Bakteri Asam Laktat dari Produk Fermentasi Kombucha Teh Dalam Menghambat Bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella thypi*. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 9(2), pp.335-344.
- Jaya, S., Bagus, I., Pratiwi, I. D. P. K., Hapsari Arihantana, N. M. I., Puspawati, N. N. 2021. Ketahanan Isolat Bakteri Asam Laktat Indigenus Kombucha dan Dadih Terhadap Antibiotik. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 10(4), pp.734-745.
- Julianto, F., Lukistyowati, I., Syawal, H. 2023. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Intestines of Eel (*Monopterus albus*) Raised in Biofloc System Cultivation. *Jurnal Akuakultur SEBATIN*, 2, pp.31–41.
- Kurnia, M., Amir, H., Handayani, D. 2020. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Makanan Tradisional Suku Rejang di Provinsi Bengkulu: “Lemea”. *Alotrop*, 4(1), pp25–32.
- Mathur, H., Beresford, T. P., Cotter, P. D. 2020. Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. *Nutrients*, 12(6), p.1679.
- Maulidayanti, S., Mubarik, N. R., Suryani. 2019. Characterisation of a bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* IN13 isolated from inasua, a fermented fish product from Central Maluku, Indonesia. *International Food Research Journal*, 26(5), 1557–1563.
- Mawardika, H., Pertiwi, K. K., Wahyuni, D., Aulia, Q. W. 2023. Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Kandidat Probiotik dari Terasi Udang Rebon. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), pp.1216–1226.
- Mayaranti, W., Yunilda Rosa, Dian P.F. 2021. Rasionalitas Penggunaan Antibiotik Dalam Pengobatan Demam Tifoid di Rumah Sakit X Tahun 2020. *Jurnal Kesehatan: Jurnal Ilmiah Multi Sciences*, 11(2), pp.101–106.
- Najah, N., Manalu, K., Nst, R. A. 2023. Karakteristik Dan Potensi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Makanan Khas Melayu (Tempoyak) Sebagai Agensi Probiotik. *Best Journal (Biologi education science & technology)*, 6(2), pp.331–337.
- Priadi, G., Setiyoningrum, F., Afiati, F., Irzaldi, R., Lisdiyanti, P. 2020. Studi in vitro Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik dari Makanan Fermentasi Indonesia. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 31(1), pp.21-28.
- Prima, H. S., Rusfidra, E. P. 2021. Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Diisolasi dari Ikan Bilih (*Mystacoleucus padangensis*) Danau Singkarak Berpotensi Sebagai Probiotik, *Jurnal mka*, 25(4), pp.8581–8596.
- Qadri, L. 2020. Penggunaan Model Pembelajaran Discoveri Learning untuk Memudahkan Siswa Memahami Materi Archabacteria dan Eukabacteria, *Jurnal Kinerja Kependidikan*, 2(1), pp.76–100.
- Rihibiha, D. 2022. Total Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Kombucha Cascara Dalam Berbagai Konsentrasi Pemanis Stevia. *Kartika Health Journal*, 17(3), pp.95-98.
- Sitorus, N., Lukistyowati, I., Syawal, H., Putra, I. 2019. Identification of Lactic Acid Bacteria from Bioflok Technology Which Has Been Gave Mollases on Red Tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture. Berkala Perikanan Terubuk*, 47, p.83.
- Suhaeni, Syakur, A. 2016. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dangke Asal Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 4(2), pp.79–83.
- Sumardi, Qatrunada, V., Farisi, S., Arifiyanto, A., Ekowati, C.N. 2021. Aktivitas Enzim Hidrolase pada Penapisan Isolat Actinomycetes Kandidat Probiotik Udang, *BIOMA: Jurnal Biologi dan Pembelajaran Biologi*, 6(1), pp.24-36

- Sya'binar, L., Erina, Sayuti, A. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (Bal) Genus *Lactobacillus* Dari Feses Orangutan Sumatera (*Pongo Abellii*) Di Kebun Binatang Kasang Kulim Bangkinang Riau, *jurnal ilmiah mahasiswa veteriner* 01(3), pp.351–359.
- Tasminto, D., Bachruddin, Z., Kurniawati, A., Muhlisin. 2021. Effect of purple sweet potato levels (*Ipomoea batatas* L.) carbohydrate sources on fermentation kinetics and lactic acid production by *Lactobacillus paracasei*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 686(1), p.12048.
- Tawali, A. B., Abdullah, N., Wiranata, B. S. 2018. Pengaruh Fermentasi menggunakan Bakteri Asam Laktat Yoghurt terhadap Citarasa Kopi Robusta (*Coffea robusta*). *Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary Journal*, pp.90–97.