

**PENGARUH LAMA FERMENTASI AIR NABEEZ KURMA
AJWA (*PHOENIX DACTYLIFERA L.*) TERHADAP
KARAKTERISTIK BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI
PROBIOTIK**

SKRIPSI



Diajukan sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada
Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah

DEMSY GIBRALTAL AULIA

2210070100117

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BAITURRAHMAM

PADANG

2026

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : Pengaruh Lama Fermentasi Air Nabeez Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L.*) Terhadap Karakteristik Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik

Disusun Oleh

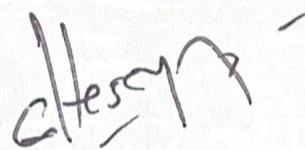
DEMSY GIBRALTAL AULIA

2210070100117

Telah disetujui

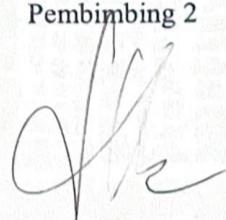
Padang, (30 Januari 2026)

Pembimbing 1



(apt. Dessy Abdullah, S.Si, M.Biomed, PhD)

Pembimbing 2



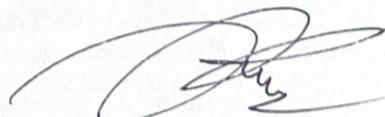
(dr. Khomeini, Sp.B)

Penguji 1



(dr. Rika Amran, MARS)

Penguji 2



(dr. Rinita Amelia, M.Biomed, PhD)

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Demsy Gibraltal Aulia
NPM : 2210070100117
Mahasiswa : Program Pendidikan Sarjana Kedokteran
Universitas Baiturrahmah, Padang

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis ini berupa skripsi dengan judul “ Pengaruh Lama Fermentasi Air Nabeez Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L.*) Terhadap Karakteristik Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik” adalah asli dan belum pernah dipublikasikan atau diajukan untuk mendapat gelar akademik di Universitas Baiturrahmah maupun di perguruan tinggi lain.
2. Karya tulis ini adalah murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan orang lain, kecuali pembimbing dan pihak lain sepengetahuan pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan judul buku aslinya serta dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Apabila terdapat penyimpangan di dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini, serta sanksi lain sesuai norma dan hukum yang berlaku.

Padang, 28 januari 2026



Demsy Gibraltal Aulia

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan Rahmat-Nya kami masih dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan Skripsi ini dilakukan dalam rangka mencapai gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah. Kami menyadari sangatlah sulit bagi kami untuk menyelesaikan Skripsi ini tanpa bantuan dari berbagai pihak sejak penyusunan skripsi sampai terselesaiannya skripsi ini. Bersama ini kami menyampaikan terima kasih yang sebesar - besarnya serta penghargaan yang setinggi – tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Musliar Kasim, MS selaku Rektor Universitas Baiturrahmah yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk menimba ilmu di Universitas Baiturrahmah.
2. dr. Yuri Haiga, Sp. N sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah yang telah memberikan sarana dan prasarana kepada kami sehingga kami dapat menyelesaikan tugas dengan baik.
3. Ibu apt. Dessy Abdullah, S.Si, M.Biomed, PhD. selaku dosen pembimbing 1 yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam penyusunan skripsi ini.
4. dr. Khomeini Sp,B selaku dosen pembimbing 2 yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam penyusunan skripsi ini.
5. dr. Rika Amran, MARS dan dr. Rinita Amelia, M.Biomed, PhD selaku dosen penguji yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga, serta memberikan saran dan arahan yang membangun demi kesempurnaan penyusunan skripsi ini.

6. Bang Yudha Endra Pratama, S.Pt, M.Biotek yang bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, saran dan arahan agar terselesaikannya penulisan skripsi ini.
7. Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada kedua orang tua tercinta, Ayah Aulia Putra B. dan Bunda Irma Suryani, yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, dukungan, motivasi, serta dorongan moral dan material. Segala pengorbanan, kesabaran, dan perhatian mereka menjadi sumber kekuatan bagi penulis dalam menghadapi berbagai tantangan, serta menjadi landasan untuk tetap bersemangat dan menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
8. Penulis menyampaikan terima kasih kepada saudara tercinta Faridz Aulia, Thora Shaula Aulia, Ghenta Zeno Aulia, dan Keanu Nouval Aulia atas doa, dukungan, serta semangat yang senantiasa diberikan. Kebersamaan dan perhatian mereka menjadi penguat batin sekaligus pendorong semangat bagi penulis dalam melewati berbagai tantangan selama proses penyusunan skripsi ini.
9. Penulis menyampaikan terima kasih kepada Nadillah Karunia Illahi atas segala bantuan, dukungan, perhatian, dan semangat yang senantiasa diberikan kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini. Kesediaan beliau untuk membantu dalam berbagai keterbatasan, memberikan motivasi, serta mendampingi penulis dalam menghadapi proses bimbingan hingga pelaksanaan sidang, memiliki peran yang sangat berarti dalam membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.

10. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rada Tri Utami atas kebersamaan, bantuan, dan dukungan yang senantiasa diberikan kepada penulis. Kehadiran beliau dalam menemani penulis, baik saat membutuhkan bantuan maupun dalam memberikan semangat, menjadi salah satu sumber motivasi yang berarti selama proses penyusunan skripsi ini.
11. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Shania Tadju Sabrina selaku teman sepayung yang telah bersama-sama menjalani proses penelitian dari awal hingga akhir, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan diselesaikan dengan baik.
12. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga Anggrek Islam, yaitu Evan Saputra Sileci, Muhammad Faris, Kevin Reyhan Arrazaq, Shidiq Herlambang Sulistio, M. Iqbal Rahman, Zilhadi Al-Asri, Nuzul Ramadhaniel, Rafid Aqil Caesarian, Ibnu Khalid Alfarel, dan Maulana Fitra Majid, yang senantiasa menemani penulis dalam canda dan kebersamaan, serta memberikan dukungan dan kehadiran yang berarti di berbagai kesempatan. Segala kebersamaan dan perhatian yang diberikan menjadi penguat semangat bagi penulis selama proses penyusunan skripsi ini.
13. Penulis menyampaikan apresiasi dan terima kasih kepada teman-teman sejawat 22ONULAR yang tidak dapat disebutkan satu per satu, atas kebersamaan, dukungan, semangat, serta doa yang diberikan selama menjalani perkuliahan hingga proses penyusunan skripsi ini
14. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada diri sendiri atas keteguhan, kesabaran, dan kerja keras yang telah dijalani hingga tahap ini. Kemampuan untuk bertahan, menghadapi berbagai tekanan, serta tetap berkomitmen dalam

menyelesaikan proses yang penuh tantangan ini menjadi pencapaian dan pembelajaran yang sangat berarti.

15. Terakhir, penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu, atas segala bantuan, dukungan, dan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT melimpahkan berkahnya dan membala kebaikan semua pihak yang membantu. Semoga skripsi ini bermanfaat serta dapat memberikan ide pemikiran yang berguna bagi kita semua

Penulis

Demsy Gibraltal Aulia

ABSTRAK

PENGARUH LAMA FERMENTASI AIR NABEEZ KURMA AJWA (*PHOENIX DACTYLIFERA L.*) TERHADAP KARAKTERISTIK BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI PROBIOTIK

Demsy Gibraltal Aulia

Latar Belakang : Bakteri Asam Laktat (BAL) berpotensi sebagai probiotik melalui produksi asam laktat dan bakteriosin, dengan pertumbuhan optimal dipengaruhi waktu fermentasi yang menurunkan pH serta meningkatkan aktivitas antimikroba. Air Nabeez kurma Ajwa kaya fenolik dan flavonoid, ideal sebagai substrat fermentasi BAL. Penelitian sebelumnya belum spesifik mengkaji variasi waktu fermentasi (8, 10, 12 jam) terhadap karakter fenotipik dan probiotik BAL.

Tujuan : Mengetahui pengaruh lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa terhadap karakteristik BAL sebagai probiotik, meliputi jumlah total koloni, identifikasi makroskopis, pewarnaan Gram, uji katalase, tipe fermentasi, serta ketahanan terhadap asam lambung, garam empedu, dan enzim pencernaan.

Metode : Penelitian eksperimental in vitro dengan post-test only design pada sampel air Nabeez difermentasi 8, 10, dan 12 jam. Data primer kuantitatif (jumlah koloni CFU/mL, viabilitas) dianalisis dengan Shapiro-Wilk, Levene, One-Way ANOVA/Tukey HSD atau Kruskal-Wallis ($p<0,05$); data kualitatif (Gram, katalase, fermentasi) dengan Chi-Square

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi lama fermentasi berpengaruh terhadap pertumbuhan dan karakteristik BAL. Jumlah total koloni BAL tertinggi diperoleh pada fermentasi selama 8 jam, sedangkan pada fermentasi 10 dan 12 jam terjadi penurunan jumlah koloni yang menunjukkan masuknya fase stasioner dan kematian. Seluruh isolat BAL yang diperoleh memiliki karakteristik Gram positif, berbentuk batang, katalase negatif, dan termasuk tipe homofermentatif. Uji ketahanan menunjukkan bahwa isolat BAL mampu bertahan pada kondisi asam lambung pH 2 dan pH 4, garam empedu Osgall 0,3% dan 0,5%, serta enzim pencernaan, sehingga memenuhi kriteria sebagai kandidat probiotik.

Kesimpulan : Lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa berpengaruh terhadap jumlah dan karakteristik Bakteri Asam Laktat. Fermentasi selama 8 jam menghasilkan jumlah BAL tertinggi, sementara seluruh isolat menunjukkan potensi sebagai probiotik.

Kata Kunci : Bakteri Asam Laktat, Air Nabeez, Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L.*), Lama Fermentasi, Probiotik.

ABSTRACT

THE EFFECT OF FERMENTATION DURATION OF AJWA DATE NABEEZ WATER (*PHOENIX DACTYLIFERA L.*) ON THE CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTICS

Demsy Gibraltal Aulia

Background: Lactic Acid Bacteria (LAB) have potential as probiotics through the production of lactic acid and bacteriocins. Their optimal growth is influenced by fermentation time, which lowers pH and enhances antimicrobial activity. Nabeez water made from Ajwa dates is rich in phenolic and flavonoid compounds, making it an ideal substrate for LAB fermentation. Previous studies have not specifically examined the effect of different fermentation durations (8, 10, and 12 hours) on the phenotypic and probiotic characteristics of LAB.

Objective: To determine the effect of fermentation duration of Ajwa date Nabeez water on the characteristics of LAB as probiotics, including total colony count, macroscopic identification, Gram staining, catalase test, fermentation type, and resistance to gastric acid, bile salts, and digestive enzymes.

Methods: This was an in vitro experimental study with a post-test only design. Nabeez water samples were fermented for 8, 10, and 12 hours. Quantitative primary data (colony counts in CFU/mL and viability) were analyzed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, followed by One-Way ANOVA with Tukey HSD or the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Qualitative data (Gram staining, catalase test, and fermentation type) were analyzed using the Chi-square test.

Results: The results showed that variations in fermentation duration significantly affected LAB growth and characteristics. The highest total LAB colony count was obtained at 8 hours of fermentation, while fermentation for 10 and 12 hours resulted in a decrease in colony numbers, indicating the transition to the stationary and death phases. All LAB isolates were Gram-positive, rod-shaped, catalase-negative, and classified as homofermentative. Resistance tests demonstrated that the LAB isolates were able to survive under simulated gastric acid conditions at pH 2 and pH 4, in bile salts (Oxgall) at concentrations of 0.3% and 0.5%, and in the presence of digestive enzymes, thereby fulfilling the criteria as probiotic candidates.

Conclusion: The fermentation duration of Ajwa date Nabeez water influences the number and characteristics of Lactic Acid Bacteria. Fermentation for 8 hours produced the highest LAB count, and all isolates exhibited potential as probiotics.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Nabeez Water, Ajwa Date (*Phoenix dactylifera L.*), Fermentation Duration, Probiotics.

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT.....</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1. Bagi Ilmu Pengetahuan Kesehatan.....	7
1.4.2. Bagi Institusi Pendidikan	7
1.4.3. Bagi Masyarakat	7
1.4.4. Bagi Peneliti	8
BAB II	9
2.1 Bakteri Asam Laktat.....	9
2.2 Fermentasi.....	11
2.2.1 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Pertumbuhan Mikroba	11
2.2.2 Fase Pertumbuhan Bakteri.....	11
2.2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi	12
2.3 Probiotik.....	12
2.4 Air Nabeez	14
2.5 Kurma Ajwa	15
2.5.1 Taksonomi	15
2.5.2 Morfologi.....	16
2.5.3 Kandungan.....	16
2.5.4 Manfaat.....	17
2.6 Isolasi dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat	20
BAB III	25
3.1 Kerangka Teori.....	25
3.2 Kerangka Konsep.....	26
3.3 Hipotesis	26
BAB IV.....	27
4.1 Ruang Lingkup Penelitian	27
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	27
4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	27

4.4	Populasi dan Sampel	27
4.5	Variabel Penelitian.....	28
4.5.1.	Variabel Bebas	28
4.5.2.	Variabel Terikat.....	28
4.6	Definisi Operasional.....	29
4.7	Cara Pengumpulan Data.....	30
4.7.1.	Alat	30
4.7.2.	Bahan.....	30
4.7.3.	Jenis Data.....	31
4.7.4.	Cara Kerja.....	31
4.8	Alur Penelitian	39
4.9	Analisis data.....	40
4.10	Jadwal Penelitian	41
BAB V	42
HASIL PENELITIAN	42
5.1	Hasil Isolasi dan Identifikasi Kurma Ajwa.....	42
5.2	Pengamatan Makroskopis.	43
5.3	Analisa Biokimia dan Pewarnaan Gram.....	44
5.4	Pengamatan Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung.....	45
5.4.1	Uji Ketahanan terhadap Asam Lambung pH 2.	45
5.4.2	Uji Ketahanan terhadap Asam Lambung pH 4.	47
5.5	Pengamatan Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu.....	48
5.5.1	Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu 0,3%.....	48
5.5.2	Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu 0,5%	50
5.6	Pengamatan Uji Ketahanan Enzim Pencernaan.....	51
BAB VI	53
6.1	Pengaruh Variasi Lama Fermentasi Air Nabeez Kurma Ajwa terhadap Jumlah Total Koloni BAL yang Berpotensi sebagai Probiotik	53
6.2	Identifikasi makroskopis isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.....	55
6.3	Uji pewarnaan Gram Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.....	58
6.4	Uji katalase Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.. ..	60
6.5	Uji tipe fermentasi Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.....	61
6.6	Uji ketahanan terhadap asam lambung isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.	63
6.7	Uji ketahanan terhadap garam empedu isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.	66
6.8	Uji ketahanan enzim pencernaan isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.....	69
BAB VII	72
7.1	Kesimpulan.....	72
7.2	Saran	73
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	83

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kadar Phenolic acid Kurma Ajwa	17
Tabel 2.2 Kadar Flavonoid Kurma Ajwa.....	17
Tabel 4. 1 Definisi Operasional	29
Tabel 4. 2 Jadwal Penelitian	41
Tabel 5. 1 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Isolasi dan Identifikasi Kurma Ajwa.	42
Tabel 5. 2 Uji <i>Post hoc Tukey HSD</i> Isolasi dan Identifikasi Kurma Ajwa	43
Tabel 5.3 Hasil Pengamatan Makroskopis.....	44
Tabel 5.4 Hasil Analisis Biokimia dan Pewarnaan Gram.....	44
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Ketahanan Terhadap Asam Lambung pH2.	46
Tabel 5. 6 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Ketahanan Terhadap Asam Lambung pH4.	47
Tabel 5.7 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Ketahanan Terhadap Garam Empedu 0.3%.....	48
Tabel 5. 8 Uji <i>Post hoc Tukey HSD</i> Ketahanan Terhadap Garam Empedu 0.3%.....	49
Tabel 5.9 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Ketahanan Terhadap Garam Empedu0.5%.....	50
Tabel 5.10 Hasil Uji <i>ONEWAY ANOVA</i> Ketahanan Terhadap Enzim Pepsin	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kurma Ajwa..... 15

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran. 1 Surat Permohonan Etik.....	83
Lampiran. 2 Etik Universitas Baiturrahmah	84
Lampiran. 3 Izin Penelitian.....	85
Lampiran. 4 Hasil Analisis Data	86
Lampiran. 5 Dokumentasi.....	94
Lampiran. 6 Biodata Peneliti	95

DAFTAR SINGKATAN

AN	: Air Nabeez
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BSC	: <i>Biological Safety Cabinet</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
DFC	: <i>Dietary Fibre Concentrate</i>
FAO	: <i>Food and Agriculture Organization</i>
FGDSP	: <i>Finely Ground Date Seeds Powder</i>
GAE	: <i>Gallic Acid Equivalent</i>
GRAS	: <i>Generally Recognized As Safe</i>
HSD	: <i>Honestly Significant Difference</i>
MRS	: <i>de Man Rogosa Sharpe</i>
QEC	: <i>Quercetin Equivalent</i>
SD	: <i>Standard Deviation</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah jenis bakteri gram positif yang tidak menghasilkan spora dan berbentuk bulat atau batang. BAL merupakan bakteri Gram positif yang mampu menghasilkan bakteriosin. Bakteriosin merupakan senyawa ekstraseluler yang terdiri dari peptida atau protein antimikroba yang berperan melawan bakteri tertentu.¹ Bakteriosin juga diketahui memiliki kemampuan untuk berfungsi sebagai biopreservatif pada bahan makanan yang dapat memperpanjang masa pakai produk.² BAL dapat dikategorikan menjadi dua yaitu, BAL homofermentatif yang hanya menghasilkan asam laktat dari gula, Sementara itu BAL heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat, alkohol, dan karbondioksida.³ Waktu fermentasi merupakan faktor penting yang sangat mempengaruhi pertumbuhan BAL dan kualitas produk fermentasi yang dihasilkan. Lama fermentasi yang optimal memungkinkan BAL berkembang secara maksimal, sehingga dapat meningkatkan produksi asam laktat, menurunkan pH, serta memperkuat aktivitas antibakteri dan antioksidan dalam produk fermentasi. Penelitian yang dilakukan M'hir, dkk (2019) menunjukkan bahwa pH dan waktu fermentasi berperan penting dalam menentukan kualitas akhir produk, karena aktivitas metabolismik BAL selama fermentasi mengubah substrat menjadi asam organik yang berkontribusi pada karakteristik sensoris dan keamanan pangan.⁴ Akan tetapi, fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kadar gula

dan peningkatan etanol, yang dapat mempengaruhi rasa, stabilitas, dan keamanan produk fermentasi.⁵

Selama proses fermentasi, BAL mengalami empat fase pertumbuhan utama, yaitu fase *lag*, *eksponensial*, *stasioner*, dan kematian pada fase *lag*, bakteri beradaptasi dengan lingkungan baru selama beberapa jam sebelum memasuki fase *eksponensial* di mana pertumbuhan berlangsung sangat cepat dan produksi metabolit seperti asam laktat meningkat. Fase *stasioner* terjadi saat nutrisi mulai menipis sehingga jumlah sel yang tumbuh seimbang dengan yang mati, diikuti fase kematian akibat menurunnya kondisi lingkungan. Pemahaman tentang fase pertumbuhan ini penting untuk mengoptimalkan proses fermentasi dan kualitas produk probiotik.⁶

BAL dapat dimanfaatkan sebagai probiotik yang dapat meningkatkan keseimbangan mikrobiota usus, mendukung pencernaan yang sehat, dan memperkuat sistem kekebalan tubuh. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang membantu inangnya apabila dikonsumsi dengan cukup.⁷ Sebagai probiotik, BAL mengandung asam amino pendek (peptida pendek / oligopeptida) yang dapat menurunkan tekanan darah, meningkatkan kekebalan tubuh, dan menghentikan enzim pembentuk kolesterol untuk mengurangi kolesterol tubuh.¹ Probiotik diperoleh dari genus BAL, terutama *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, yang merupakan flora biasa di saluran pencernaan.⁸ Probiotik dapat juga ditemui di pangan fermentasi, salah satunya adalah produk kurma.

Air Nabeez adalah minuman tradisional yang dibuat dengan merendam buah kurma Ajwa dalam air putih selama satu malam. Proses perendaman ini

menghasilkan cairan yang kaya akan nutrisi dan senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, vitamin, mineral (zat besi, kalium, kalsium, fosfor, magnesium), serta senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan air Nabeez kurma Ajwa bervariasi tergantung lama perendaman dan jumlah buah kurma yang digunakan, dengan kadar fenolik tertinggi ditemukan pada perendaman 24 jam.⁹ Selain itu, Air Nabeez juga memiliki aktivitas imunomodulator yang dapat meningkatkan respon imun non-spesifik, seperti peningkatan aktivitas fagositosis dan indeks organ limfoid, dengan dosis optimum pada perendaman 12-18 jam.¹⁰ Minuman ini dipercaya membantu menetralkan keasaman lambung, meningkatkan pencernaan, serta mendukung fungsi organ tubuh seperti limpa, hati, dan prostat.¹¹ Secara keseluruhan, Air Nabeez kurma Ajwa merupakan sumber nutrisi dan senyawa bioaktif yang potensial sebagai substrat fermentasi untuk mendukung pertumbuhan BAL.

Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera* L. var. Ajwa) secara khusus dipilih dalam penelitian ini karena memiliki komposisi bioaktif paling tinggi dibandingkan varietas kurma lainnya. Menurut penelitian Hussain (2019), kurma ajwa memiliki kadar senyawa fenolik tertinggi sebesar 7,80 mg GAE/100 g berat kering, diikuti oleh varietas Khalas sebesar 7,28 mg GAE/100 g, dan kurma Mabroom memiliki kadar senyawa fenolik terendah sebesar 4,65 mg GAE/100 g. Kandungan flavonoid keseluruhan juga sangat berbeda, dengan Ajwa memiliki kadar tertinggi sebesar 4,54 mg EQ/100 g, diikuti oleh Khalas dengan 4,3 mg EQ/100 g.¹² Dengan kandungan bioaktif yang tinggi tersebut menjadikan Ajwa sebagai kandidat substrat fermentasi yang paling potensial untuk menunjang pertumbuhan BAL. Meskipun kurma Ajwa bukan tanaman asli Indonesia, konsumsinya di Indonesia semakin

meluas dan memiliki nilai religius serta simbolis yang tinggi di masyarakat Muslim. Kurma Ajwa dikenal sebagai "kurma Nabi" dan sering dikonsumsi terutama pada bulan Ramadan dan musim haji. Oleh karena itu, penelitian fermentasi Air Nabeez kurma Ajwa tetap relevan secara budaya dan konsumsi, terutama dalam konteks pengembangan produk probiotik alami berbasis bahan pangan yang sudah populer di masyarakat Indonesia.¹³

Penelitian yang dilakukan Abdullah Safar dan Mohd Sajjad (2017), mereka melihat bagaimana probiotik dari produk biji kurma, seperti *Finely Ground Date Seeds Powder* (FGDSP), *Aqueous Extract of Date Seed Powder* (AEDSP), dan *Dietary Fibre Concentrate* (DFC), dapat membantu pertumbuhan *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Hasil menunjukkan bahwa FGDSP secara signifikan dapat meningkatkan jumlah BAL hingga 2×10^8 CFU/mL, dan pH turun dari 6,2 menjadi 3,2-3,9. Ini menunjukkan bahwa produk biji kurma dapat berpotensi sebagai alternatif substrat karbon yang mendukung pertumbuhan BAL selama fermentasi.¹⁴ Menurut penelitian yang dilakukan oleh Abdullah Al Maliki, So-Hyun Yoon, Ahmad Firoz, dkk (2022) dengan mengisolasi 20 strain *Lactobacillus* dari fermentasi kurma Ajwa Madinah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga strain KAU001, KAU002, KAU003 dapat bertahan dalam saluran pencernaan dan melekat pada mukosa usus. Selain itu, KAU001 dan KAU002 memiliki potensi untuk berfungsi sebagai probiotik yang dapat memberikan manfaat kesehatan, terutama dalam hal metabolisme dan reaksi hipersensitivitas. Hal ini ditunjukkan melalui kemampuannya untuk memberikan efek antioksidan, menghentikan aktivitas enzim α -glukosidase, menurunkan kadar kolesterol, dan memiliki efek antiinflamasi.¹⁵

Penelitian yang dilakukan Ariel Alfattah Syah (2024), dengan mengidentifikasi lima isolat BAL dari fermentasi air Nabeez kurma Ajwa yang menunjukkan karakteristik probiotik, seperti viabilitas tinggi pada kondisi asam dan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Namun, penelitian tersebut belum mengkaji secara spesifik pengaruh lama variasi lama fermentasi terhadap karakteristik dan aktivitas probiotik BAL yang dihasilkan.¹⁶ Sementara itu, penelitian yang dilakukan Halimatul Afifah dan Endah Budi Permana Putri (2022) mengenai air Nabeez kurma membuktikan bahwa lama perendaman dan suhu penyimpanan mempengaruhi kadar etanol dan total gula akibat aktivitas mikroba selama fermentasi. Semakin lama perendaman, kadar etanol meningkat dan total gula menurun, serta suhu dingin dapat memperlambat proses fermentasi. Namun, penelitian ini hanya melihat perubahan komponen kimia tanpa mengkaji secara mendalam pertumbuhan dan karakteristik probiotik BAL selama proses fermentasi.⁵

Dengan latar belakang tersebut, menjadi penting untuk mengevaluasi bagaimana variasi waktu fermentasi memengaruhi karakteristik BAL yang tumbuh pada substrat Air Nabeez kurma Ajwa. Penelitian ini bertujuan untuk menjawab pertanyaan tersebut dengan pendekatan eksperimental yang terfokus. Penelitian ini memiliki novelty, yaitu mengevaluasi pengaruh waktu fermentasi yang spesifik (8, 10, 12 jam) terhadap karakter fenotipik BAL (jumlah koloni, uji Gram, katalase, ketahanan terhadap asam lambung, garam empedu, dan enzim). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah untuk optimalisasi fermentasi Nabeez Ajwa sebagai produk probiotik alami berbasis pangan fungsional.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah variasi lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L.*) berpengaruh terhadap karakteristik BAL sebagai probiotik?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa terhadap karakteristik BAL sebagai probiotik

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui pengaruh variasi lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa terhadap jumlah total koloni BAL yang berpotensi sebagai probiotik.
- b. Mengetahui identifikasi makroskopis Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.
- c. Mengetahui uji pewarnaan Gram Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.
- d. Mengetahui uji katalase Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.
- e. Mengetahui uji tipe fermentasi Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.
- f. Mengetahui uji ketahanan terhadap asam lambung isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.
- g. Mengetahui uji ketahanan terhadap garam empedu isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.

- h. Mengetahui uji ketahanan enzim pencernaan isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi Ilmu Pengetahuan Kesehatan

- a. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh variasi lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa terhadap karakteristik dan potensi probiotik BAL.
- b. Sebagai bahan ilmu pengetahuan dan informasi mengenai karakteristik isolat probiotik dari air Nabeez kurma Ajwa.

1.4.2. Bagi Institusi Pendidikan

- a. Sebagai data penelitian bagi institusi dan civitas akademik Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah.
- b. Menjadi bahan bacaan, referensi, dan sebagai bahan perbandingan bagi peneliti selanjutnya agar didapatkan hasil penelitian yang lebih baik lagi.

1.4.3. Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat probiotik pada air Nabeez kurma Ajwa, antara lain membantu menjaga kesehatan pencernaan, meningkatkan daya tahan tubuh, menurunkan kadar kolesterol, serta mendukung kesehatan jantung. Diharapkan informasi ini dapat mendorong masyarakat untuk mengonsumsi minuman sehat berbahan alami yang bermanfaat bagi tubuh.

1.4.4. Bagi Peneliti

Dalam ilmu kesehatan penelitian ini diharapkan dapat membantu meningkatkan pengetahuan tentang pengaruh lama variasi fermentasi dan manfaat probiotik yang terkandung pada air Nabeez kurma Ajwa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat

BAL adalah kelompok mikroorganisme yang mampu menghasilkan berbagai senyawa antibakteri, seperti bakteriosin, asam organik, dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Karena sifatnya yang aman untuk dikonsumsi, BAL biasanya dikenal sebagai *generally recognized as safe* (GRAS) selama proses fermentasi. Beberapa jenis genera yang termasuk BAL adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*¹⁷

BAL merupakan kelompok mikroorganisme gram positif yang tidak membentuk spora, berbentuk bulat atau batang, bersifat anaerob fakultatif, serta tidak memiliki kemampuan bergerak (non motil). Bakteri ini mampu hidup pada kisaran pH rendah sekitar 3,8, memiliki sifat proteolitik dengan kebutuhan asam amino tertentu, dan dapat tumbuh optimal pada suhu antara 37°C hingga 45°C.¹⁷ Tipe bakteri fermentasi asam laktat adalah homofermentatif (hasil fermentasinya hanya asam laktat) dan heterofermentatif (hasil fermentasi termasuk asam organik seperti CO_2 , etanol, dan asetat).¹⁸

BAL secara luas ditemukan pada berbagai produk pangan fermentasi yang telah menjadi bagian penting dalam pola makan manusia sejak zaman dahulu. Produk-produk yang mengandung BAL meliputi hasil fermentasi susu seperti *yoghurt*, keju, mentega, dan *sour cream*; sayuran fermentasi seperti *sauerkraut* (kol asam), *kimchi*, dan berbagai jenis acar; roti *sourdough* yang menggunakan BAL

dalam fermentasi adonannya; produk daging fermentasi seperti *cold cuts* dan sosis fermentasi; serta minuman fermentasi seperti *wine*, bir, dan cuka. Selain itu, BAL juga berperan dalam proses fermentasi silase sayuran yang digunakan sebagai pakan ternak. Kehadiran BAL pada produk-produk ini tidak hanya berfungsi untuk memperpanjang umur simpan dan meningkatkan keamanan pangan melalui produksi asam laktat, asam organik, dan bakteriosin, tetapi juga memberikan manfaat kesehatan bagi konsumen karena kandungan probiotiknya yang dapat meningkatkan bioavailabilitas nutrisi, aktivitas antioksidan, dan biosintesis vitamin dalam makanan.¹⁹

BAL merupakan kelompok mikroorganisme yang banyak ditemukan pada berbagai makanan fermentasi dan dikenal memiliki peran penting sebagai probiotik. Sebagai probiotik, BAL adalah mikroba hidup yang, bila dikonsumsi dalam jumlah cukup, mampu memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya, terutama dalam menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan. Manfaat BAL sebagai probiotik meliputi pencegahan diare, penurunan kadar kolesterol, peningkatan sistem kekebalan tubuh, potensi sebagai antikanker, serta membantu menjaga berat badan dan kesehatan saluran cerna. Selain itu, konsumsi pangan fermentasi yang mengandung BAL juga dapat meningkatkan nilai gizi, memperbaiki tekstur dan rasa, serta memperpanjang umur simpan produk. BAL memiliki beberapa karakteristik utama sebagai probiotik, diantaranya mampu bertahan pada kondisi asam lambung dan garam empedu, memiliki kemampuan menempel pada permukaan saluran pencernaan, serta mampu berkoagregasi dan bersinergi dengan mikroba lain.²⁰

2.2 Fermentasi

2.2.1 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Pertumbuhan Mikroba

Lama fermentasi sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroba, khususnya BAL, yang merupakan mikroorganisme utama dalam proses fermentasi. Pada awal fermentasi, jumlah mikroba biasanya masih rendah karena mereka memasuki fase *lag*, yaitu adaptasi terhadap lingkungan baru. Seiring berjalannya waktu fermentasi, mikroba mulai memanfaatkan substrat, seperti gula, untuk berkembang biak dan menghasilkan metabolit fermentasi seperti asam laktat, sehingga jumlah mikroba meningkat signifikan.

2.2.2 Fase Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri terdiri atas empat tahap utama, yaitu fase *lag*, *eksponensial*, *stasioner*, dan kematian. Fase *lag* merupakan periode adaptasi dimana bakteri menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan baru, yang dipengaruhi oleh komposisi media, jumlah inokulum awal, pH, suhu, dan kondisi fisiologis mikroba sebelumnya. Fase ini biasanya berlangsung dari beberapa menit hingga beberapa jam. Selanjutnya, fase *eksponensial* adalah periode pertumbuhan cepat dimana bakteri membelah secara aktif dengan laju yang dipengaruhi oleh suhu, pH, nutrisi, dan sifat genetik mikroba. Pada fase *stasioner*, laju pertumbuhan bakteri seimbang dengan laju kematian akibat menipisnya nutrisi dan penumpukan produk metabolit. Terakhir, fase kematian terjadi ketika jumlah bakteri yang mati melebihi jumlah yang tumbuh karena kondisi lingkungan yang semakin tidak mendukung.⁶

2.2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi

2.2.3.1 pH

pH merupakan salah satu faktor kunci yang mempengaruhi aktivitas dan pertumbuhan mikroorganisme selama fermentasi. Setiap mikroba memiliki rentang pH optimal untuk pertumbuhan dan aktivitas enzimatiknya. pH yang terlalu rendah dapat memperlambat proses fermentasi, sedangkan pH yang terlalu tinggi dapat meningkatkan aktivitas fermentasi namun berisiko menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan seperti gliserin. Ketidaksesuaian pH akan menurunkan efisiensi fermentasi dan memengaruhi kualitas produk akhir.²¹

2.2.3.2 Suhu

Suhu optimal fermentasi biasanya berada di kisaran 30–40°C, yang mendukung aktivitas enzim dan metabolisme mikroba. Suhu di luar kisaran ini dapat memperlambat atau menghentikan fermentasi.²¹

2.3 Probiotik

Menurut *The Joint Food and Agriculture Organization* (FAO) dan *World Health Organization* (WHO), probiotik merupakan mikroba hidup yang ditawarkan kepada manusia dalam jumlah yang memadai dan dapat memberikan manfaat untuk kesehatan inangnya. Pada tahun 2006, komite kerjasama antara FAO dan WHO menetapkan sejumlah kriteria untuk penerimaan probiotik. Kriteria tersebut mencakup:²²

1. Penentuan kelompok dan jenis mikroba.
2. Uji laboratorium untuk menilai kemampuan probiotik, seperti ketahanan terhadap asam lambung, kemampuan antimikroba probiotik dalam

melawan bakteri berbahaya, atau kemampuan probiotik dalam mengurangi penempelan bakteri berbahaya pada sel.

3. Strain probiotik tersebut terbukti aman untuk dikonsumsi dan tidak terdapat kontaminasi pada bentuk pemberiannya.
4. Percobaan secara langsung telah dilakukan untuk menilai fungsi dan manfaatnya pada hewan inang atau manusia sehat.

Probiotik dikatakan memberikan manfaat bagi tubuh manusia melalui beberapa cara utama, yaitu: persaingan terhadap patogen, peningkatan fungsi penghalang usus, pengaturan sistem imun tubuh, dan penciptaan neurotransmitter. Probiotik bersaing dengan patogen dalam memperoleh nutrisi dan menempel pada reseptor di permukaan usus, sehingga mempersulit patogen untuk bertahan di saluran pencernaan. Selain itu, probiotik juga berfungsi sebagai agen antimikroba dengan memproduksi berbagai zat seperti asam lemak rantai pendek, asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin, yang dapat mengurangi jumlah patogen di usus. Probiotik memperbaiki fungsi penghalang usus dengan merangsang produksi protein musin dan mengatur ekspresi protein *tight junction*, seperti occludin dan claudin, yang memainkan peran penting dalam mempertahankan integritas usus. Selain itu, probiotik juga dapat mengatur respon imun bawaan maupun adaptif pada tubuh inang.²³

Probiotik banyak terkandung dalam berbagai sayuran, buah-buahan, serta tanaman polong, termasuk jenis polong-polongan seperti arcis, buncis, dan kacang polong. Beberapa buah yang mengandung probiotik antara lain adalah pisang, serta berry, yang mencakup *strawberry*, *blueberry*, *cranberry*, dan *raspberry*. Di antara sayuran, terdapat asparagus dan beragam jenis bawang, seperti bawang perai,

bawang putih, dan bawang bombay. Zat berserat ini juga dapat ditemukan dalam produk makanan siap saji seperti sereal, biskuit, roti, selai roti, dan yogurt.²⁴

2.4 Air Nabeez

Air Nabeez adalah minuman yang terbuat dari perpaduan air putih dan kurma yang telah direndam semalam. Selain menggunakan kurma, minuman ini juga dapat dibuat dengan berbagai jenis buah-buahan atau kombinasi antara buah-buahan dan kurma. Air nabeez telah dikonsumsi sejak lama dan dianggap memiliki berbagai manfaat untuk kesehatan. Secara umum, air nabeez termasuk kategori *infused water* yang mengandung berbagai nutrisi, seperti serat, protein, karbohidrat, gula, kalium, kalsium, fosfor, magnesium, tembaga, zat besi, dan antioksidan.²⁵

Air Nabeez yang berasal dari kurma ajwa menunjukkan kemampuan antioksidan yang sangat baik dan berpotensi melindungi dari berbagai penyakit degeneratif yang disebabkan oleh radikal bebas. Selain itu, air Nabeez bisa menjadi pilihan sumber antioksidan alami yang aman untuk dikonsumsi dalam jangka panjang, berbeda dengan antioksidan buatan yang mungkin dapat menyebabkan efek samping. Dengan rasa yang lezat dan cara pembuatan yang mudah, air Nabeez dijadikan minuman fungsional sehari-hari untuk membantu menjaga kesehatan serta mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif.²⁶

Ayat yang berbicara tentang minum air rendaman kurma terdapat pada Q.S An-Nahl (16) ayat 67 :

وَمِنْ ثَمَرَتِ الْتَّحِيلِ وَالْأَعْبَرِ تَنْخُدُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَعَيْلَةً لِّقُومٍ يَعْقِلُونَ

Artinya : Dari buah kurma dan anggur, kamu membuat minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengerti.

2.5 Kurma Ajwa

2.5.1 Taksonomi

Secara taksonomi, kurma (*Phoenix dactylifera L.*) diklasifikasikan sebagai berikut:²⁷

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subkelas	: <i>Arecidae</i>
Ordo	: <i>Arecales</i>
Family	: <i>Arecaceae</i>
Genus	: <i>Phoenix</i>
Spesies	: <i>Phoenix dactylifera L.</i>



Gambar 2.1 Kurma Ajwa

2.5.2 Morfologi

Kurma ajwa merupakan buah yang memiliki bentuk oval dengan panjang kira-kira 2,459 cm, berat sekitar 5,13 g, diameter sekitar 1,84 cm, dengan ketebalan daging sekitar 0,46 cm.²⁸ Kurma adalah sejenis pohon palma yang umumnya memiliki ketinggian antara 15 hingga 25 meter, kadang-kadang dapat mencapai hingga 36 meter. Akar pohon ini bisa tumbuh hingga 25 meter dan mampu menyusup ke dalam tanah hingga kedalam 6 meter. Batangnya berwarna coklat, memiliki ketebalan yang signifikan, dan berbentuk silindris, dengan diameter sekitar 1 meter. Diameter batangnya tidak bertambah seiring dengan pembentukan tajuk daun. Daun kurma memiliki panjang antara antara 3 hingga 6 meter, dan pelepas daun dapat melebihi 0,5 meter dengan bentuk yang meruncing dan memiliki duri. Setiap daun terdiri dari 120 hingga 240 anak daun yang berbentuk lancip dengan panjang antara 15 hingga 100 cm dan lebar 1 hingga 6 cm.²⁹

2.5.3 Kandungan

Kurma Ajwa mengandung karbohidrat dalam jumlah yang cukup tinggi, yakni sekitar 44–88%, serta memiliki kadar serat pangan yang cukup besar, yaitu antara 6,4–11,5%. Selain itu, buah ini juga mengandung lemak dalam kisaran 0,2–0,5% dan protein sekitar 2,3–5,6%. Kurma ajwa juga kaya akan berbagai vitamin, mineral, dan asam lemak seperti asam palmitat, oleat, linoleat, dan linolenat.³⁰ Dibandingkan dengan jenis kurma dan buah kering lainnya, kurma ajwa memiliki kandungan polifenol yang lebih tinggi. Buah ini juga mengandung flavonoid dengan efek antiinflamasi, seperti ethyl acetate dan metanolik, yang mampu menghambat kerja enzim prooksidatif lipid, yaitu COX-1 dan COX-2. Selain itu,

kurma Ajwa juga mengandung selenium yang bersifat antimutagenik, sehingga dapat membantu melawan zat karsinogenik dan mutagenik dalam tubuh..⁹

Tabel 2.1 Kadar Phenolic acid Kurma Ajwa¹³

Phenolic acid	Jumlah (mg/100gr)
Caffeic acid	0.026 – 0.050
Ferullic acid	2.52 – 3.20
Protocatechuic acid	1.27 – 2.20
Catechin	0.50 – 0.80
Gallic acid	13.90 – 14.10
p- coumaric acid	3.08 – 3.50
Chlorogenic acid	0.18 – 0.20
Resorcinol acid	0.03 – 0.05
Total phenols	22.10 – 455.80

Tabel 2.2 Kadar Flavonoid Kurma Ajwa¹³

Flavonoid	Quantity (mg/100 mg)
Quercetin	1.21
Luteolin	0.04
Rutin	0.86
Iso- quercetin	0.41
Apigenin	0.26
Total flavonoid	2.78

2.5.4 Manfaat

1. Sebagai Antioksidan

Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L.*) merupakan salah satu jenis buah yang mengandung banyak senyawa bioaktif, seperti fenolik, flavonoid, antosianin, dan karotenoid. Berdasarkan hasil penelitian, kadar senyawa fenolik dalam kurma Ajwa

berkisar antara 200 hingga 1000 mg GAE per 100 gram, sedangkan kandungan flavonoidnya berada dalam kisaran 300 sampai 1200 mg QEC per 100 gram. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki hubungan yang erat dengan aktivitas antioksidan yang tinggi, yang mampu menangkal radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. Oleh karena itu, mengonsumsi kurma Ajwa secara teratur berpotensi mencegah penyakit degeneratif seperti kanker dan gangguan kardiovaskular, serta memperlambat proses penuaan pada tingkat seluler.³⁰

2. Sebagai Antitumor dan Antikanker

Kurma Ajwa mengandung flavonoid utama seperti apigenin, quercetin, dan luteolin yang berperan penting dalam menurunkan kadar sitokin proinflamasi dan menghambat perkembangan tumor. Studi pada hewan coba menunjukkan bahwa ekstrak kurma Ajwa mampu menurunkan kadar IL-1 β , TNF- α , dan IL-6, serta merangsang apoptosis (kematian sel terprogram) pada sel kanker. Selain itu, ekstrak metanolik kurma Ajwa juga terbukti dapat meningkatkan produksi ROS dalam sel kanker, menyebabkan stres oksidatif dan akhirnya kematian sel kanker. Hal ini menegaskan potensi kurma Ajwa sebagai agen antikanker dan antitumor yang alami.³⁰

3. Sebagai Antihiperlipidemia

Penelitian pada hewan uji, khususnya kelinci yang mengalami hiperlipidemia, menunjukkan bahwa konsumsi kurma Ajwa secara signifikan mampu menurunkan kadar trigliserida, kolesterol total, dan LDL, serta meningkatkan kadar HDL. Manfaat ini diperkirakan berasal dari tingginya kandungan polifenol dan flavonoid

dalam kurma Ajwa, yang berperan dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti glutathione peroksidase, katalase, dan superokida dismutase dalam sirkulasi darah. Oleh karena itu, kurma Ajwa dinilai efektif dalam mendukung kesehatan kardiovaskular dan mencegah gangguan pada jantung.³⁰

4. Sebagai Hepatoprotektif

Ekstrak kurma Ajwa terbukti mampu melindungi hati dari kerusakan akibat paparan zat toksik seperti CCl₄ (karbon tetraklorida). Penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa kelompok yang diberi ekstrak kurma Ajwa mengalami penurunan perubahan histologis dan area fibrosis pada hati, serta peningkatan sistem pertahanan antioksidan. Efek hepatoprotektif ini sangat penting untuk mencegah penyakit hati kronis dan menjaga fungsi hati secara optimal.³⁰

5. Sebagai Nefroprotektif

Studi pada tikus yang diinduksi neuropati diabetik menunjukkan bahwa pemberian kurma Ajwa dapat menormalkan kadar kreatinin urin dan memperbaiki mikroalbuminuria, sehingga menurunkan risiko gagal ginjal akibat komplikasi diabetes. Efek nefroprotektif ini diduga berkaitan dengan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari senyawa bioaktif dalam kurma Ajwa.³⁰

6. Sebagai Gastrointestinal Protektif

Ekstrak kurma Ajwa juga memiliki efek protektif terhadap mukosa lambung, dengan cara menurunkan sekresi asam lambung berlebih dan menetralkan asam lambung. Kandungan flavonoid, tanin, saponin, dan vitamin C berperan sebagai antioksidan yang melindungi lambung dari kerusakan akibat radikal bebas dan

enzim proteolitik. Dengan demikian, kurma Ajwa dapat membantu mencegah terjadinya ulkus lambung dan gangguan pencernaan lainnya.³⁰

7. Sebagai Antimikroba

Ekstrak metanol dan aseton dari kurma Ajwa terbukti dapat menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme patogen, termasuk bakteri Gram-positif, Gram-negatif, serta jamur seperti *Fusarium*. Studi *in vitro* juga menunjukkan bahwa kurma Ajwa efektif melawan bakteri seperti *Klebsiella pneumoniae* dan *Escherichia Coli*, sehingga berpotensi sebagai agen antimikroba alami yang dapat mendukung sistem imun tubuh.³⁰

2.6 Isolasi dan Karakteristik Bakteri Asam Laktat

1. Isolasi Bakteri Asam Laktat

BAL diperoleh dari fermentasi spontan daging buah kurma Ajwa. Koloni BAL yang terbentuk tampak berbentuk bulat dengan warna putih, disertai zona bening di sekitarnya. Menurut Nuryadi, dkk (2013), munculnya zona bening tersebut menunjukkan bahwa isolat mampu mengolah glukosa sebagai sumber energi, yang kemudian menghasilkan senyawa asam sebagai metabolit sekundernya.²⁴

2. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan teknik penting dalam mikrobiologi untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan perbedaan struktur dinding selnya, yang membagi bakteri menjadi dua kelompok utama: Gram-positif dan Gram-negatif. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh ilmuwan asal Denmark, Hans Christian

Gram, pada tahun 1884. Bakteri Gram-positif memiliki dinding sel yang tebal dan kaya peptidoglikan, memungkinkan mereka mempertahankan warna ungu dari kristal violet meskipun telah melalui proses pelunturan dengan alkohol. Selain itu, dinding selnya juga mengandung asam teikoat yang membantu mempertahankan kekakuan struktural. Di sisi lain, bakteri Gram-negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis (sekitar 1–3 nm) dan ditutupi oleh membran luar yang mengandung lipid serta lipopolisakarida. Saat proses pewarnaan, alkohol melarutkan lipid di membran luar ini sehingga warna kristal violet terlepas, dan bakteri kemudian terwarnai merah oleh pewarna pembanding safranin. Perbedaan ini tidak hanya penting untuk identifikasi bakteri, tetapi juga mempengaruhi sifat kimia dan fisik bakteri, termasuk ketahanan terhadap antibiotik dan lingkungan. BAL diklasifikasikan sebagai Gram-positif karena memiliki dinding sel dengan peptidoglikan tebal yang khas.²⁴

b. Pengamatan Bentuk Sel

Pengamatan bentuk sel dapat dilakukan sekaligus dengan pengujian pewarnaan gram, dan hasil dari pewarnaan gram tersebut kemudian diperiksa menggunakan mikroskop. BAL terbagi dalam beberapa famili, yaitu *Lactobacillaceae* yang meliputi genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* berbentuk batang; *Streptococcaceae* yang mencakup genus *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Aerococcus* berbentuk bulat; serta *Micrococcaceae* dengan genus *Micrococcus* dan *Staphylococcus*.²⁴

c. Uji Katalase

Uji katalase merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya enzim katalase pada bakteri, dengan cara menambahkan hidrogen peroksida (H_2O_2) ke dalam sampel. Robert dkk. (1995) mengatakan jika bakteri menghasilkan gelembung gas, hal ini menunjukkan reaksi positif karena enzim katalase memecah H_2O_2 menjadi air dan oksigen. Sebaliknya, jika tidak muncul gelembung, maka uji menunjukkan hasil negatif, yang menjadi salah satu ciri khas BAL. Sebagai bakteri anaerob fakultatif, BAL tidak memproduksi enzim katalase, melainkan menghasilkan enzim peroksidase yang memecah H_2O_2 menjadi air dan senyawa organik tanpa menimbulkan gelembung gas.²⁴

d. Uji Tipe Fermentasi

Rahayu dan Margiono (1997) dalam Yusmarini dkk. (2009) menjelaskan bahwa pengujian tipe gas yang dihasilkan dari glukosa bertujuan untuk mengamati pembentukan gas selama proses inkubasi guna mengenali jenis fermentasi glukosa oleh isolat BAL. Apabila tabung Durham menunjukkan adanya gas, hal ini menandakan bahwa bakteri telah memfermentasi sebagian dari glukosa menjadi gas CO_2 selain memproduksi asam. Saminen dkk. (2004) menyatakan bahwa BAL homofermentatif hanya menghasilkan asam laktat melalui proses glikolisis, sementara BAL heterofermentatif akan memproduksi asam asetat, etanol, dan CO_2 sebagai tambahan terhadap asam laktat.²⁴

e. Ketahanan Terhadap Asam Lambung

Probiotik yang mengandung BAL perlu mampu bertahan di dalam sistem pencernaan untuk sampai ke usus halus. BAL tersebut harus tahan terhadap tingkat keasaman rendah di lambung (pH 2-3). Proses makanan sampai ke lambung

memakan waktu kurang lebih 90 menit. Viabilitas BAL dapat berkurang pada kondisi asam yang rendah.²⁴

f. Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Kemampuan bertahan terhadap garam empedu merupakan salah satu kriteria penting bagi BAL yang akan dimanfaatkan sebagai probiotik. Asam empedu dikenal bersifat toksik terhadap sel hidup, sehingga mikroorganisme di dalam saluran pencernaan harus memiliki sistem perlindungan untuk menghadapi efek merusaknya (Salen dan Batta, 2004). Viabilitas isolat BAL dalam media mengandung 0,3% dan 0,5% oxgall pada awal pengujian menunjukkan rentang 21,43–188,89% dan 76,97–162,96%. Setelah diinkubasi selama 5 jam, isolat BAL A22. 4 menunjukkan viabilitas tertinggi (195,54%) jika dibandingkan dengan yang lainnya. Temuan ini menunjukkan bahwa *Lactobacilli* umumnya dapat bertahan di lingkungan saluran pencernaan dengan konsentrasi garam empedu yang cukup tinggi. Penurunan viabilitas beberapa isolat BAL pada waktu 0 jam kemungkinan disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran sel pada bakteri Gram-positif, yang menyebabkan keluarnya komponen intraseluler akibat lisis sel dan berujung pada kematian sel.²⁴

g. Ketahanan Terhadap Enzim Pencernaan

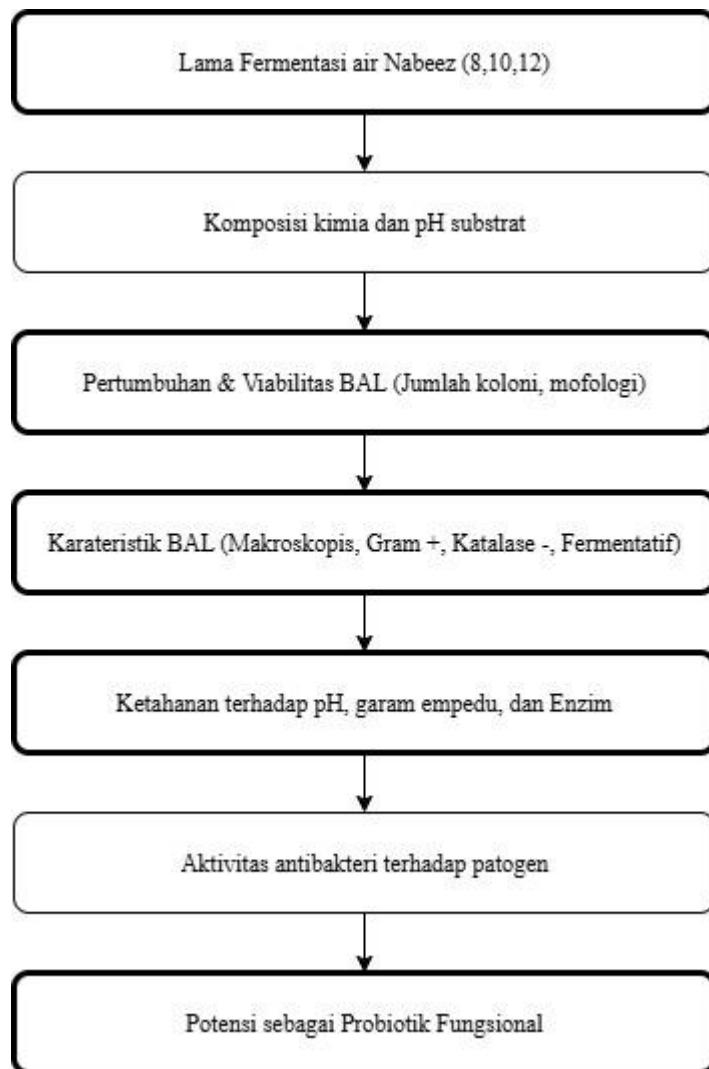
Uji ketahanan bakteri terhadap enzim pencernaan merupakan metode yang digunakan untuk menilai kemampuan bakteri, khususnya kandidat probiotik, dalam bertahan hidup setelah terpapar enzim pencernaan seperti pepsin dan tripsin pada kondisi yang menyerupai saluran cerna manusia (pH lambung, usus, dan suhu tubuh) selama waktu tertentu; pengujian ini umumnya dilakukan dengan

menginkubasi suspensi bakteri dalam larutan simulasi cairan lambung dan usus, kemudian menghitung jumlah bakteri yang masih hidup menggunakan metode *plate count* pada media selektif, di mana hasilnya dinyatakan dalam persentase viabilitas atau log CFU/mL sebagai indikator potensi probiotik.³¹

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



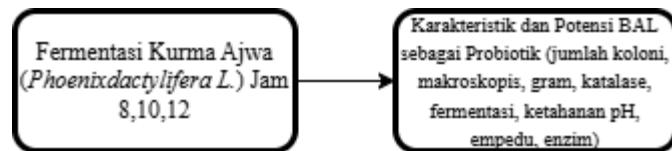
Kerangka Teori 3.1

Keterangan :

 : Diteliti

 : Tidak Diteliti

3.2 Kerangka Konsep



Kerangka Konsep 3.2

3.3 Hipotesis

H_0 : Lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa tidak berpengaruh signifikan terhadap karakteristik bakteri asam laktat sebagai probiotik.

H_1 : Lama fermentasi air Nabeez kurma Ajwa berpengaruh signifikan terhadap karakteristik bakteri asam laktat sebagai probiotik.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini mencakup ilmu kedokteran bidang Bioteknologi, Mikrobiologi, Farmakologi, dan Ilmu Gizi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Baiturrahmah ± 2 bulan.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *Eksperimental laboratorium* secara *in vitro* , rancangan penelitian yang dipakai *post test only design*, yaitu pengukuran variabel hanya dilakukan setelah perlakuan tanpa pengukuran awal (pretest), sehingga fokus pada perbandingan hasil posttest antar kelompok untuk menilai efek perlakuan secara langsung

4.4 Populasi dan Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah kurma Ajwa matang yang didapat dari distributor kurma Ajwa Castle Farms Indonesia PT. Hasta Niaga Berkah bersertifikat KEMTAN RI PL 327507035460524 yang dapat ditemui melalui https://sipsat.badanpangan.go.id/okkp/registrasi?no_reg=Hasta%20niaga%20berkah

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

1. Kurma Ajwa (*Phoenix dactylifera L*).
2. Lama fermentasi

4.5.2. Variabel Terikat

1. Hitung total koloni BAL
2. Karateristik makroskopis
3. Pewarnaan Gram
4. Uji katalase
5. Uji fermentasi
6. Uji ketahanan terhadap asam lambung
7. Uji ketahanan terhadap garam empedu
8. Uji ketahanan terhadap enzim pencernaan

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Hitung total Isolat BAL	Hasil hitung isolat BAL yang telah dianalisis karakteristiknya	CFU (<i>Colony Forming Unit</i>)	Rasio	CFU/ml
2.	Karakteristik Makroskopis	Sifat atau ciri suatu objek yang diamati secara langsung tanpa memerlukan alat bantu.	Pengamatan Langsung	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Bentuk • Ukuran • Warna • Tekstur • Tepi
3.	Pewarnaan Gram	Hasil pewarnaan Gram menunjukkan perbedaan pada struktur dinding sel bakteri, membedakan bakteri gram positif atau negatif.	Mikroskop	Nominal	Gram-positif berwarna ungu dan Gram-negatif berwarna merah atau merah muda
4.	Uji katalase	Metode untuk mendeteksi aktivitas enzim katalase dalam sel mikroorganisme	Slide Mikroskop	Nominal	Gelembung (+) / (-)
5.	Uji tipe fermentasi	Uji yang digunakan untuk melihat apakah mikroorganisme bisa mengubah gula menjadi asam laktat	Tabung Durham	Nominal	Gas (+) / (-)
6.	Uji ketahanan terhadap asam lambung	Uji laboratorium untuk menilai kemampuan isolat probiotik bertahan di kondisi pH rendah asam lambung	Inkubasi dalam MRS Broth pH 2 dan 4, hitung CFU/mL	Rasio	Persentase viabilitas (%) atau log CFU/mL
7.	Uji ketahanan terhadap garam empedu	Uji laboratorium untuk menilai kemampuan isolat probiotik bertahan pada garam empedu.	Inkubasi + hitung koloni sebelum dan sesudah	Rasio	Persentase viabilitas (%) atau log CFU/mL
8.	Uji ketahanan enzim pencernaan	Ketahanan bakteri terhadap enzim pencernaan adalah kemampuan bakteri untuk tetap hidup setelah terpapar enzim pencernaan pada kondisi menyerupai saluran cerna manusia	Inkubasi + plate count sebelum dan sesudah	Rasio	Persentase survival (%) atau log CFU/mL

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam laboratorium mikrobiologi meliputi *autoklaf* untuk sterilisasi, *Biological Safety Cabinet (BSC)* sebagai ruang kerja aseptik, pembakar *bunsen* untuk sterilisasi alat secara langsung, serta berbagai peralatan gelas seperti cawan *petri*, tabung reaksi, *erlenmeyer*, gelas *beaker*, dan gelas ukur. Selain itu, digunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* untuk menghomogenisasi larutan, inkubator dan *shaker* inkubator untuk proses inkubasi mikroorganisme, serta tabung *eppendorf* dan *vortex* untuk pengadukan sampel. Alat lain yang diperlukan antara lain *hockey stick* dan jarum ose untuk penanaman mikroba, gelas objek dan kaca benda (preparat) untuk pengamatan mikroskopis, *Laminar Air Flow* sebagai ruang kerja steril, *colony counter Quebec* untuk menghitung koloni, anaerob jar untuk menumbuhkan mikroba anaerob, serta berbagai pipet seperti pipet mikro, pipet tetes, dan tip pipet mikro. Selain itu, *sentrifuge* digunakan untuk pemisahan partikel, mistar dan jangka sorong untuk pengukuran, minyak imersi untuk pengamatan mikroskop dengan pembesaran tinggi, mikroskop sebagai alat utama pengamatan, timbangan analitik untuk penimbangan bahan, tabung *Durham* untuk mendeteksi produksi gas mikroba, dan *aluminium foil* untuk pembungkusan alat atau media.

4.7.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam proses fermentasi adalah daging buah kurma Ajwa dan air (*aqua*). Media isolasi yang dipakai meliputi *MRS Agar (de Mann Rogosa Sharpe Agar)* dan *MRS Broth (de Mann Rogosa Sharpe Broth)*.

Untuk keperluan uji biokimia dan pewarnaan Gram, bahan-bahan yang digunakan antara lain alkohol 70% dan 96%, *asam asetat* (C₂H₂O₄), *hidrogen peroksid* (H₂O₂) 3%, *iodin*, *kristal violet*, *reagen Biuret*, *safranin*, *parafin*, minyak imersi.

4.7.3. Jenis Data

Jenis data pada penelitian ini menggunakan data primer, yaitu data yang diperoleh langsung peneliti melalui pengamatan dan pengujian laboratorium terhadap sampel air Nabeez kurma Ajwa yang difermentasi dalam waktu 8,10,dan 12 jam.

Data yang dikumpulkan terdiri dari:

- Data kuantitatif, seperti: Jumlah total koloni BAL dalam CFU/mL. Viabilitas BAL terhadap asam lambung, garam empedu, dan enzim pencernaan
- Data kualitatif, seperti: Pewarnaan Gram (positif/negatif), Uji katalase (positif/negatif), Tipe fermentasi (homofermentatif/heterofermentatif), Ciri-ciri makroskopis koloni

Pengambilan data dilakukan setelah proses fermentasi selesai pada masing-masing waktu inkubasi (8, 10, dan 12 jam).

4.7.4. Cara Kerja

4.7.4.1 Sterilisasi Alat

Pertama, gelas dan cawan petri dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik yang tahan panas. Media *MRS agar* dituangkan ke dalam gelas *erlenmeyer*, dibungkus dengan aluminium foil, dan juga ditempatkan dalam

kantong plastik tahan panas. Seluruh peralatan dan bahan tersebut kemudian disterilkan menggunakan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.³²

4.7.4.2 Pembuatan Air Nabeez

Kurma Ajwa dicuci dengan air mengalir untuk membersihkannya. Biji dan daging kurma dipisahkan. Tujuh potong daging kurma direndam dalam 600 ml air matang steril dan dibiarkan pada suhu ruang (±20–30°C) selama 8, 10, dan 12 jam untuk memungkinkan terjadinya proses fermentasi alami oleh BAL. Setelah waktu fermentasi tercapai, sampel selanjutnya disimpan pada suhu rendah (±4°C) untuk memperlambat aktivitas metabolismik bakteri sebelum dilakukan proses pengolahan lebih lanjut. Setelah itu, kurma dihaluskan untuk menghasilkan suspensi.^{33,34}

4.7.4.3 Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

1. Semua peralatan seperti tabung reaksi, cawan *petri*, *erlenmeyer*, *tip pipet mikro*, dan *hockey stick* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit untuk memastikan kebersihan dan menghilangkan mikroorganisme.
2. Media MRS Broth disiapkan dengan melarutkan 52,2 gram dalam 1000 ml air distilasi, kemudian dihomogenisasi menggunakan pengaduk magnetik di atas *hot plate* pada suhu 100°C, dan selanjutnya disterilkan dengan *autoklaf* pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.
3. Media *MRS Agar* dibuat dengan melarutkan 68,2 gram *MRS Agar* dalam 1000 ml air distilasi, dihomogenisasi pada suhu 100°C menggunakan pengaduk magnetik, kemudian disterilkan dalam *autoklaf*. Setelah mendingin hingga

sekitar 55°C, media dituangkan ke dalam cawan *petri* sebanyak kurang lebih 8 ml per cawan.

4. Kurma Ajwa sebanyak 1 gram ditimbang dan dicampur dengan 9 mL larutan MRS Broth. Pengambilan isolat dilakukan sebelum proses penyimpanan pada suhu refrigerasi, selanjutnya campuran dihomogenisasi menggunakan *vortex* hingga homogen.
5. Pengenceran dimulai dengan memasukkan larutan pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung anaerob dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, 100 μ l dari pengenceran 10^{-1} dicampurkan dengan 900 μ l larutan *MRS Broth* dalam tabung *eppendorf* dan dihomogenisasi dengan *vortex* hingga merata, menghasilkan pengenceran 10^{-2} . Proses pengenceran serial ini dilanjutkan hingga mencapai pengenceran 10^{-7} .
6. Selanjutnya, 100 μ l dari pengenceran 10^{-7} diambil dan ditanam menggunakan metode sebar pada cawan petri berisi media *MRS Agar*. Setelah itu, permukaan media diratakan dengan *hockey stick* yang telah disterilkan menggunakan alkohol dan dibakar dengan *bunsen* di dalam *laminar air flow*. Inokulum kemudian disimpan dalam tabung anaerob dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
7. Setelah 48 jam inkubasi, koloni tunggal yang menunjukkan ciri khas BAL (bulat, licin, berwarna putih krem) dipindahkan ke media *MRS Agar* menggunakan jarum *ose* dengan metode streak kuadran untuk pemurnian koloni. Koloni ini kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.
8. Koloni hasil pemurnian tersebut kemudian dilakukan proses pengayaan dan pengujian lebih lanjut sesuai kebutuhan penelitian.

4.7.4.4 Karakteristik Makroskopik

Media yang digunakan adalah *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) Broth. BAL dibiarkan berkembang selama 48 jam pada suhu 37°C, kemudian ditanam dengan cara penyebaran saat inokulasi dan disimpan dalam tempat anaerobik. Koloni BAL yang tunggal, berbentuk bulat, halus, berwarna putih, dan kuning selanjutnya dipindahkan ke media *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) untuk pemurnian koloni dengan teknik *streak* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.7.4.5 Karakteristik Mikroskopik (Pewarnaan Gram)

BAL diambil dari hasil pemurnian pada media *MRS Agar* menggunakan ose steril. Selanjutnya, preparat ulas dibuat di atas objek gelas dan difiksasi dengan cara melewatkannya di atas nyala api *bunsen*. Preparat kemudian diberi tetesan larutan *kristal violet* selama 1 menit, dicuci dengan aquades, dan dijemur hingga kering. Setelah itu, larutan *lugol* ditetes selama 1 menit, diikuti dengan pencucian kembali menggunakan aquades dan pengeringan. Tahap *dekolorisasi* (proses pewarnaan gram) dilakukan dengan meneteskan *aseton alkohol* selama 10–30 detik, kemudian preparat dicuci dengan aquadest. Selanjutnya, larutan *safranin* ditetes selama 30 detik sebagai pewarna kontras, lalu dicuci kembali dengan aquades dan dikeringkan. Preparat yang telah selesai kemudian diamati menggunakan *mikroskop* dengan perbesaran 100x dan *minyak imersi* untuk melihat karakteristik morfologi bakteri secara detail.³⁵

4.7.4.6 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menempatkan satu ose koloni isolat BAL pada kaca objek. Kemudian, tambahkan 1-2 tetes H₂O₂ 3%. Jika terlihat gelembung

udara, maka hasilnya positif, sedangkan tidak adanya gelembung menunjukkan hasil negatif.³⁵

4.7.4.7 Uji Tipe Fermentasi

Isolat BAL dimasukkan dengan 5 ml *MRS Broth* dari *Himedia*, lalu dimasukkan ke dalam tabung *Durham* yang diletakkan terbalik. Selanjutnya, tabung tersebut diinkubasi selama 24 jam, dan diperiksa untuk melihat ada atau tidaknya gelembung udara di dalam tabung *Durham*.¹⁶

4.7.4.8 Uji Mengukur Ketahanan Terhadap Asam Lambung

Isolat BAL yang tahan terhadap lingkungan lambung diuji dengan cara menambahkan 0,1 ml suspensi BAL dari *MRS Broth* dengan pH 2 dan pH 4 ke dalam tabung yang berisi 9 ml *MRS Broth* steril. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Durasi ini disesuaikan dengan waktu makanan berada di lambung, yaitu 90 menit. Tingkat viabilitas dihitung berdasarkan jumlah koloni yang muncul setelah proses inkubasi (kekeruhan) atau jumlah bakteri yang hidup (CFU/ml). Setelah periode inkubasi, koloni yang berkembang dihitung secara manual atau dengan menggunakan alat penghitung koloni (*Colony Counter*).

Penghitungan viabilitas BAL dihitung dengan rumus :

$$\text{Penurunan jumlah koloni (\%)} = \frac{\text{Total BAL awal} - \text{Total BAL akhir}}{\text{Total BAL awal}} \times 100\%$$

4.7.4.9 Uji Mengukur Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Sebanyak 1 ml kultur BAL diinokulasikan (pemindahan mikroorganisme) ke dalam media *MRS Broth* yang telah disuplementasi dengan Oxgall pada konsentrasi 0,3% dan 0,5%. Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam.

Setelah inkubasi, 100 μ l sampel diambil untuk dilakukan peremajaan (*enrichment*) dengan memindahkannya ke dalam tabung *Eppendorf* yang berisi 900 μ l *MRS Broth*. Pengamatan dilakukan pada dua titik waktu, yaitu pada awal inkubasi (0 jam) dan setelah inkubasi selama 5 jam. Hasil pertumbuhan jumlah koloni BAL pada medium yang mengandung garam empedu kemudian dibandingkan dengan jumlah pertumbuhan BAL pada media *MRS Broth* tanpa penambahan garam empedu untuk menilai tingkat ketahanannya.³⁶

Penghitungan viabilitas BAL dihitung dengan rumus :

$$\text{Viabilitas (\%)} = 100\% - \text{Penurunan jumlah koloni (\%)}$$

$$\text{Penurunan jumlah koloni (\%)} = \frac{\text{Total BAL awal} - \text{Total BAL akhir}}{\text{Total BAL awal}} \times 100\%$$

4.7.4.10 Total Koloni BAL⁴

- a. Semua alat yang digunakan dalam penelitian ini, termasuk cawan *petri* (*petridish*), tabung reaksi, *erlenmeyer*, tabung *eppendorf*, pipet mikro, dan *hockeystick*, terlebih dahulu disterilkan menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit untuk memastikan kebersihan dan mencegah kontaminasi mikroorganisme.
- b. Media pengencer disiapkan dengan melarutkan 0,93 gram *Mann Rogosa Sharpe* (MRS) *Broth* dalam volume aquades sesuai kebutuhan, kemudian dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* pada suhu 100°C. Setelah homogen, media tersebut disterilkan dengan *autoklaf* pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.
- c. Media *MRS Agar* disiapkan dengan melarutkan 68,2 gram *MRS Agar* dalam 1000 ml aquades, kemudian dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* di

atas hot plate pada suhu 100°C. Setelah itu, media disterilkan dengan *autoklaf* dan didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 55°C sebelum dituangkan ke dalam cawan *petri* sebanyak 8 ml per cawan.

- d. Sebanyak 1 gram kurma Ajwa diambil menggunakan sendok steril, kemudian dilarutkan dalam 9 ml larutan MRS Broth dalam tabung reaksi dan dihomogenisasi menggunakan *vortex* hingga merata, menghasilkan pengenceran awal 10^{-1}
- e. Selanjutnya, 100 μ l suspensi dari pengenceran 10^{-1} dipindahkan ke tabung *eppendorf* yang berisi 900 μ l larutan MRS Broth dan dihomogenisasi kembali dengan *vortex* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Proses pengenceran serial ini dilanjutkan hingga mencapai pengenceran 10^{-7} .
- f. Kemudian, sebanyak 100 μ l sampel dari pengenceran 10^{-7} ditanam pada media MRS Agar menggunakan metode sebar (*spread plate*) dan diratakan dengan *hockey stick* yang telah disterilkan menggunakan alkohol dan dibakar dengan *bunsen* di dalam *laminar air flow* untuk menjaga kondisi aseptik.
- g. Setelah inokulum disimpan dalam tabung anaerob, proses inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Penghitungan koloni BAL yang tumbuh dilakukan menggunakan alat penghitung koloni Quebec setelah masa inkubasi selesai. Jumlah koloni yang terbentuk kemudian dicatat sebagai indikator pertumbuhan BAL dalam sampel
- h. Hasil perhitungan koloni BAL dikalikan dengan 10, kemudian total BAL dihitung dengan rumus berikut :

Total Koloni BAL Colony Forming Unit (CFU)/G =

$$\text{Jumlah koloni BAL} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

4.7.4.11 Uji Ketahanan Terhadap Enzim Pencernaan³¹

- a. Isolat bakteri diaktifkan terlebih dahulu dalam media MRS broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam hingga mencapai fase logaritmik pertumbuhan.
- b. Cairan lambung buatan dibuat dengan cara mengencerkan larutan asam klorida (HCl) ke dalam air secara bertahap sambil diaduk, kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter hingga mencapai pH 2,0 dan 3,0. Setelah pH yang diinginkan tercapai, ditambahkan 10 gram pepsin dan diaduk hingga homogen, kemudian volume larutan disesuaikan menjadi 1000 mL dengan air.
- c. Cairan usus buatan disiapkan dengan melarutkan 6,8 gram kalium dihidrogen fosfat dalam air, lalu pH-nya disesuaikan menjadi 6,8 menggunakan larutan NaOH. Selanjutnya, 10 gram pankreatin dilarutkan dalam air, dan volume akhir juga disesuaikan menjadi 1000 mL.
- d. Kedua cairan ini kemudian disterilkan menggunakan membran filter 0,22 μm dan disimpan untuk digunakan.
- e. Suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam cairan lambung buatan, diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C, dan dihitung tingkat kelangsungan hidupnya pada jam ke-0 dan ke-3.
- f. Setelah inkubasi, sebanyak 1 mL cairan lambung buatan yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam 9 mL cairan usus buatan, lalu diinkubasi kembali secara anaerob pada suhu 37°C.
- g. Tingkat kelangsungan hidup bakteri dihitung kembali pada jam ke-0 dan ke-3 di dalam cairan usus buatan.

- h. Jumlah koloni bakteri (CFU/mL) sebelum dan sesudah perlakuan dibandingkan untuk menentukan *survival rate* dengan rumus:

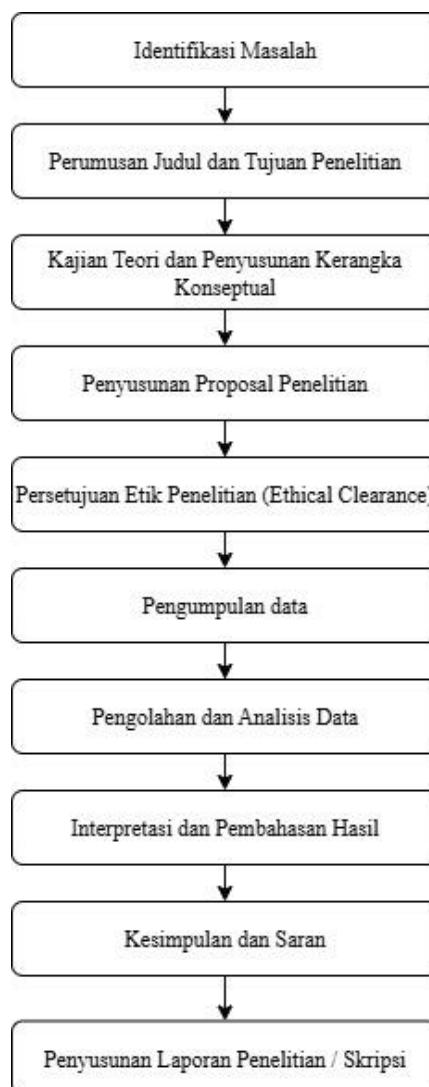
$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\log N_t \text{ (CFU)}}{\log N_0 \text{ (CFU)}} \times 100\%$$

N₀ = jumlah bakteri hidup sebelum perlakuan

N_t = jumlah bakteri hidup setelah perlakuan.

- i. Hasil uji dinyatakan dalam persentase *survival rate* atau log CFU/mL sebagai indikator ketahanan bakteri terhadap enzim pencernaan.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan laboratorium akan dianalisis secara kuantitatif maupun kualitatif. Untuk data kuantitatif, seperti jumlah koloni BAL, ketahanan terhadap asam lambung, garam empedu, dan enzim pencernaan, terlebih dahulu akan dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test* dan uji homogenitas varians menggunakan *Levene test*. Apabila data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, maka analisis dilanjutkan dengan *One-Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Jika ditemukan perbedaan yang bermakna, maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Tukey HSD* untuk mengidentifikasi kelompok mana yang berbeda secara signifikan. Sebaliknya, apabila data tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* sebagai alternatif non-parametrik untuk membandingkan kelompok perlakuan. Sementara itu, untuk data kualitatif atau kategorik, seperti hasil uji Gram, fermentasi, dan katalase, analisis dilakukan menggunakan uji *Chi-Square* guna mengetahui adanya perbedaan proporsi antar kelompok perlakuan. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan taraf signifikansi $p < 0,05$, sehingga hasil dianggap signifikan secara statistik apabila nilai p kurang dari 0,05.

4.10 Jadwal Penelitian

Tabel 4. 2 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan									
	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Sep	Okt	Nov	Des	Jan
Penyusunan Laporan Proposal										
Ujian Proposal										
Perizinan Penelitian										
Penelitian dan Pengambilan Sampel										
Pengolahan Data										
Penyusunan Laporan Akhir										
Ujian Hasil dan Revisi										