



## Identifikasi dan Uji Aktivitas Antimikrobia Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Singkong (Gatot) terhadap *Bacillus cereus* dan *Aspergillus flavus*

### Identification and Antimicrobial Activity Test of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Cassava (Gatot) Against *Bacillus cereus* and *Aspergillus flavus*

Maria Hesty Febriana<sup>1</sup>, Ekawati Purwijantiningsih<sup>1\*</sup>, Pramana Yuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
Jl. Babarsari No.44, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia  
Email : [ekawati.purwijantiningsih@uajy.ac.id](mailto:ekawati.purwijantiningsih@uajy.ac.id) \*Penulis korespondensi

#### Abstract

Gatot is a traditional food from fermented cassava. *Lactic acid bacteria* (LAB) can be found in fermented cassava food, gatot. *Lactic acid bacteria* can produce an antimicrobial compound for inhibiting pathogen microorganism. The aim of this research were isolation and identification LAB from gatot and antimicrobial activity test against *Bacillus cereus* and *Aspergillus flavus*. Three isolates from raw gatot and three isolates from cooked gatot used in this research. Isolation of LAB was conducted using pour plate method, purification is conducted by streak plate method, the antimicrobial test was conducted by agar well diffusion and molecular identification was conducted by PCR colony method using LABFw and R16RDNA-1492bac primer. Lactic acid bacteria from cooked gatot identified as *Enterococcus* sp. FTBUAJY04, *Enterococcus* sp. FTBUAJY05, *Enterococcus* sp. FTBUAJY06, while LAB from raw gatot identified as *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY01, *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY02 dan *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY03. The results obtained from the inhibition zone test showed that all isolates were able to inhibit the growth of *B. cereus* and *A. flavus*. The greatest inhibition zone against *B. cereus* was shown by LAB Gt5 supernatant or *L. lactis* supernatant strain FTBUAJY02 of  $1.87 \pm 0.67 \text{ cm}^2$ , while the results of the greatest inhibition zone against *A. flavus* was LAB Gt6 supernatant or *L. lactis* supernatant strain FTBUAJY03 of  $3.83 \pm 0.73 \text{ cm}^2$ .

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Molecular Identification, *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*

#### Abstrak

Gatot merupakan salah satu makanan tradisional dari singkong yang mengalami fermentasi spontan sehingga dimungkinkan terdapat bakteri asam laktat (BAL). Salah satu keuntungan dengan adanya BAL dari suatu produk pangan terutama gatot yaitu dapat memproduksi senyawa antimikrobia sehingga dapat menghambat mikroorganisme patogen. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi BAL dari gatot dan mengidentifikasinya dengan pendekatan molekuler, serta melakukan uji aktivitas antimikrobia terhadap *Bacillus cereus* dan *Aspergillus flavus*. Sebanyak 6 isolat BAL yaitu 3 isolat BAL berasal dari gatot matang dan 3 isolat berasal dari gatot mentah digunakan dalam penelitian ini. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode *pour plate*, purifikasi BAL dilakukan dengan metode *streak plate*, identifikasi molekuler dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer LABFw dan primer R16RDNA-1492bac, serta uji zona hambat menggunakan metode sumuran. Spesies BAL yang terdapat dalam gatot matang berupa *Enterococcus* sp. FTBUAJY04, *Enterococcus* sp. FTBUAJY05, *Enterococcus* sp. FTBUAJY06, sedangkan spesies BAL dari gatot mentah adalah *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY01, *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY02 dan *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY03. Hasil yang diperoleh dari uji zona hambat menunjukkan semua isolat

mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *Aspergillus flavus*. Zona hambat paling besar terhadap *B. cereus* ditunjukkan oleh supernatan BAL Gt5 atau supernatan *L. lactis* strain FTBUAJY02 sebesar  $1,87 \pm 0,67 \text{ cm}^2$ , sedangkan hasil zona hambat paling besar terhadap *A. flavus* yaitu supernatan BAL Gt6 atau supernatan *L. lactis* strain FTBUAJY03 sebesar  $3,83 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ .

**Kata Kunci :** Bakteri Asam Laktat, Identifikasi Molekuler, *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*

Diterima: 21 Agustus 2020, disetujui: 20 Januari 2021

## Pendahuluan

Gatot merupakan salah satu makanan khas Gunung Kidul, Yogyakarta yang dibuat dengan melakukan fermentasi spontan pada singkong (Lestari *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian, bakteri asam laktat (BAL) yang ditemukan pada gatot antara lain *Lactobacillus plantarum-pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, dan *Pediococcus* sp. (Rahayu, 2003).

Salah satu keuntungan dengan adanya BAL pada suatu produk pangan terutama gatot yaitu dapat memproduksi senyawa antimikrobia sehingga dapat menghambat mikroorganisme patogen (Saad *et al.*, 2001; Purwijantiningsih, 2011). Oleh sebab itu, BAL dari gatot perlu diisolasi, diidentifikasi dan dilakukan uji antimikrobia terhadap mikroorganisme yang sering mengkontaminasi produk tinggi karbohidrat. *Bacillus cereus* merupakan salah satu bakteri yang sering mengkontaminasi produk tinggi karbohidrat dan dapat menyebabkan keracunan berupa diare dan muntah. Diare dapat muncul 8-16 jam sesudah mengkonsumsi bahan pangan yang mengandung bakteri tersebut maupun sporanya (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2014).

Selain bakteri, terdapat kapang yang sering mengkontaminasi produk singkong kering dan produk kacang-kacangan yaitu *Aspergillus flavus*. Kontaminasi *A. flavus* ini disebabkan oleh kadar air pada gaplek yang masih tinggi sehingga ketika disimpan dapat mengakibatkan adanya pertumbuhan jamur (Oramahi, 2006). *Aspergillus flavus* yang mengkontaminasi suatu produk pangan sangat berbahaya karena dapat membentuk aflatoksin yang menyebabkan kanker kulit, sirosis hati, gangguan sistem saraf pusat, dan induksi tumor (Adiyanto, 2015).

Identifikasi BAL yang terdapat dalam produk gatot dilakukan dengan pendekatan molekuler karena memiliki beberapa kelebihan yaitu proses cepat, lebih spesifik, lebih sensitif, tidak membutuhkan banyak tenaga, dan lebih efisien untuk mengidentifikasi bakteri dibandingkan metode konvensional (Magistrado *et al.*, 2001; Keramas *et al.*, 2004). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui spesies BAL yang dapat bertahan hidup pada gatot dan mengetahui kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *B. cereus* dan *A. flavus*. Apabila spesies dari BAL sudah diketahui maka dapat dikulturkan untuk ditambahkan pada produk fermentasi lokal seperti gatot maupun pada produk olahan berbahan baku karbohidrat yang mudah terkontaminasi oleh *B. cereus* dan *A. flavus*.

## Metode Penelitian

### Isolasi bakteri asam laktat (BAL)

BAL yang diisolasi dalam penelitian ini berasal dari gatot mentah dan gatot matang yang diperoleh dari Pasar Kotagede Yogyakarta. Isolasi BAL dilakukan dengan menggunakan metode *pour plate*, sedangkan purifikasi BAL dilakukan dengan metode *streak plate*. Medium yang digunakan untuk isolasi dan purifikasi BAL adalah *medium deMan Rogosa Sharpe Agar (MRS)*. Sebanyak 6 isolat BAL yang berasal dari gatot mentah maupun matang digunakan untuk penelitian tahap selanjutnya.

Isolasi dan purifikasi BAL dilakukan dengan cara menghaluskan sampel gatot matang dan gatot mentah, kemudian diambil sebanyak 10 gram, lalu dimasukkan ke dalam 90 ml BPW dan dihomogenkan dengan vortex sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Sampel dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil sebanyak 1 ml

dan dimasukkan pada tabung reaksi yang berisi 9 ml BPW kemudian dihomogenkan dengan vortex sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Perlakuan pengenceran sampel dilakukan hingga didapatkan tingkat pengenceran  $10^{-4}$ .

Setiap sampel dari hasil pengenceran diambil sebanyak 1 ml dan diratakan pada cawan petri secara *pour plate* dengan medium MRS agar yang ditambahkan 0,5% kalsium karbonat. Cawan petri lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam atau 2 hari. Hasil positif BAL terlihat adanya zona bening pada koloni tunggal. Kultur BAL dimurnikan pada medium MRS agar secara *streak plate* lalu diinkubasi kembali pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Kultur BAL murni kemudian diambil dan dipindah pada medium MRS *Broth* kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam lalu disimpan pada lemari es suhu  $4^{\circ}\text{C}$  (Putri et al., 2012).

### Identifikasi molekuler

Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan marker gen 16S rRNA lalu dilakukan amplifikasi dengan metode PCR koloni menggunakan primer LABFw (5'-GAGTTTGATYDTGGCTCAG-3') dan primer R16SRDNA-1492bac (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Komposisi campuran PCR untuk total reaksi 50  $\mu\text{L}$  yaitu 25  $\mu\text{L}$  MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix, 0,5  $\mu\text{L}$  masing-masing pasangan primer 10  $\mu\text{M}$ , 1 koloni tunggal BAL dan ditambahkan dengan ddH<sub>2</sub>O hingga total volume reaksi 50  $\mu\text{L}$ . Tahap yang dilakukan dalam proses amplifikasi adalah pre-denaturasi menggunakan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik, tahap denaturasi menggunakan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik, tahap *annealing* menggunakan suhu  $55^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, tahap *extension* pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 90 detik, tahap *final extension* pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit, dan tahap *hold* pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  sedangkan siklus yang digunakan adalah sebanyak 35x (Nanasombat et al., 2012 dengan modifikasi).

Hasil amplifikasi BAL dengan metode PCR lalu dilakukan visualisasi hasil menggunakan elektroforesis dengan tegangan 100v dan waktu yang digunakan adalah 20 menit. Konsentrasi agarose yang digunakan untuk visualisasi sebesar 1,4%. Gen yang digunakan untuk identifikasi adalah 16S rRNA. Hasil positif adanya BAL adalah

dihasilkan *band* dengan ukuran 1500bp ketika dilihat pada UV transiluminator (Malik et al., 2010)

Sekuensing DNA dilakukan dengan mengirimkan hasil amplifikasi DNA ke laboratorium 1st BASE sequencing int, Malaysia. Adapun metode sekuensing yang digunakan yaitu metode Spancer. Hasil sekuensing lalu dikonversi menggunakan program Bioedit sehingga diperoleh format dalam bentuk FASTA. Selanjutnya, untuk mengkonfirmasi spesies dari BAL dilakukan BLASTing melalui website NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Nurhayati et al., 2011). Selanjutnya dilakukan analisis pohon filogeni menggunakan metode Neighbor-joining tree dengan pengulangan (*bootstrap*) 1000x pada aplikasi MEGA6. Melalui metode Neighbor joining tree dapat diketahui adanya perubahan basa yang berkaitan dengan adanya evolusi yang dilihat dari panjang cabang yang terbentuk (Pearson et al., 1999). Spesies yang digunakan dalam rekonstruksi pohon filogeni adalah *Enterococcus durans* strain JCM 8725, *Enterococcus durans* strain 98D, *Enterococcus durans* strain NBRC 100479, *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* strain L105, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* strain NBRC 1009331, *Lactococcus lactis* strain NBRC 100933, *Lactococcus lactis* strain NCDO 604. Outgroup yang digunakan adalah spesies *Leuconostoc mesenteroides* strain FLSJ.

### Pengujian aktivitas antimikrobia

Preparasi supernatant BAL dapat dilakukan dengan cara kultur bakteri asam laktat diambil sebanyak 1 ose lalu dimasukkan pada 10 ml MRS *broth* kemudian dilakukan inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk kultur BAL Gt4, Gt5, dan Gt6, sedangkan untuk BAL Gt1, Gt2, dan Gt3 dilakukan inkubasi selama 48 jam. Perbedaan waktu inkubasi ini disebabkan BAL Gt4, Gt5, dan Gt6 sudah tumbuh optimum selama 24 jam, sedangkan BAL Gt 1, Gt2, dan Gt3 optimum tumbuh selama 48 jam. Kultur BAL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Nilai pH dari supernatant diukur yang selanjutnya dapat digunakan untuk uji antibakteri dan antifungi (Yang & Chang, 2010).

Uji aktivitas antimikrobia dilakukan dengan metode difusi agar sumuran.

Rancangan percobaan yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah rancangan acak lengkap dengan pengulangan sebanyak 5 kali setiap perlakuan. Perlakuan yang digunakan berupa pengujian supernatan dari ke-6 isolat BAL gatot yaitu isolat BAL gatot 1 (Gt1), BAL gatot 2 (Gt2), BAL gatot 3 (Gt3), BAL gatot 4 (Gt4), BAL gatot 5 (Gt5), BAL gatot 6 (Gt6) terhadap *Aspergillus flavus* dan *Bacillus cereus*.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara *pour plate* dengan cara *Bacillus cereus* diambil sebanyak 1000 µl lalu ditambahkan medium NA sebanyak 20 ml. Sumuran lalu dibuat pada medium dengan menggunakan sedotan yang memiliki diameter 5 mm dengan letak saling berjauhan. Supernatan dari BAL kemudian dimasukkan pada sumuran masing-masing sebanyak 100 µl. Cawan petri lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur dengan menggunakan penggaris (Abel *et al.*, 2014).

Uji aktivitas antifungi dapat dilakukan dengan cara medium PDA disiapkan sebanyak 20 ml pada cawan petri lalu ditunggu hingga memadat. *Aspergillus flavus* dengan kerapatan spora  $6,4 \times 10^7$  spora/ml diambil sebanyak 100 µl lalu secara *spread plate* diratakan pada medium dengan trigalski yang sudah disterilisasi pada alkohol 70%. Sumuran dibuat pada medium dengan menggunakan perforator nomor 3 atau dengan diameter 6 mm yang letaknya saling berjauhan. Supernatan dari BAL kemudian dimasukkan pada sumuran masing-masing sebanyak 100 µl. Cawan petri lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk di

sekitar sumuran diukur dengan menggunakan penggaris (Yang & Chang, 2010). Luas zona hambat dari zona bening yang terbentuk dihitung dengan rumus berikut.

$$\text{Luas zona hambat} = 3,14 \times \left[ \left[ \frac{d_2}{2} \right]^2 - \left[ \frac{d_1}{2} \right]^2 \right] \text{cm}^2$$

Keterangan:

d1 = diameter sumuran (0,6 cm)

d2 = rata-rata diameter zona hambat (cm)

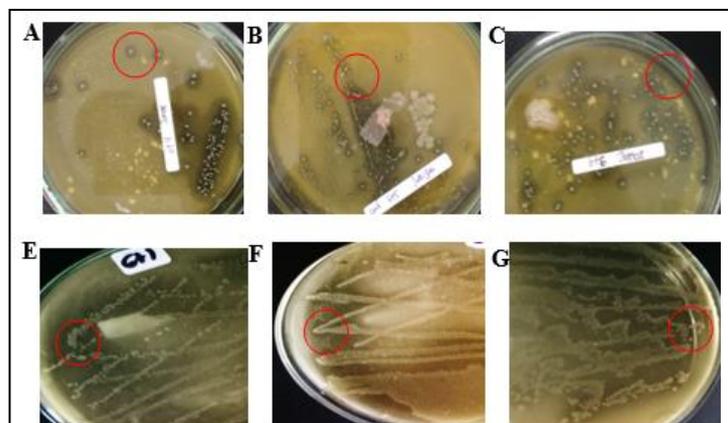
### Analisa Data

Hasil data penelitian berupa luas zona hambat akan dianalisis menggunakan ANAVA untuk mengetahui ada tidaknya beda nyata luas zona hambat yang terbentuk dari masing-masing BAL dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Apabila terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT menggunakan tingkat kepercayaan 95%. Software yang digunakan adalah SPSS versi 15.0 (Gasperz, 1991).

## Hasil dan Pembahasan

### Isolasi dan Pemurnian Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari gatot yang tumbuh paling baik yaitu pada pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$ . Hasil yang diperoleh sebanyak 6 isolat yaitu BAL Gt1, Gt2, Gt3 yang berasal dari fermentasi singkong atau gatot matang, serta BAL Gt4, Gt5, dan Gt6 yang berasal dari fermentasi singkong atau gatot mentah (Gambar 1).

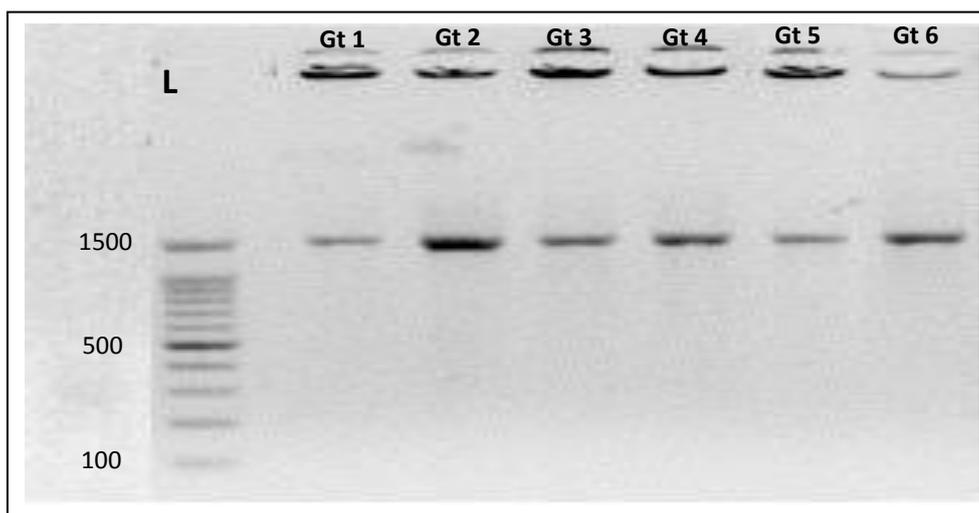


**Gambar 1.** Hasil pemurnian BAL dari Fermentasi Singkong (Gatot) mentah dan matang : Isolat BAL Gt4 (A), BAL Gt5 (B), BAL Gt6 (C) dari gatot mentah, dan isolat BAL Gt1 (D), BAL Gt2 (E), BAL Gt3 (F) dari gatot matang, sedangkan lingkaran merah menunjukkan koloni tunggal BAL.

### Analisis Molekuler

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis (Gambar 2) dapat diketahui bahwa hasil positif dari amplifikasi ditandai dengan adanya *band* berukuran 1500 bp. Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing sampel yaitu isolat BAL Gt1, BAL Gt2, BL

Gt3, BAL Gt4, Bal Gt5, dan BAL Gt6 positif mengandung DNA sehingga dapat dilakukan sekuensing. Seperti yang dikatakan oleh Anyogu *et al.* (2014) bahwa hasil elektroforesis yang positif selanjutnya dilakukan sekuensing.



**Gambar 2.** Hasil Visualisasi Elektroforesis Isolat BAL dari gatot. ( L = DNA Ladder Smobio 100 bp; Gt1 = Isolat BAL Gt1; Gt2 = Isolat BAL Gt2; Gt3 = Isolat BAL Gt3; Gt4 = Isolat BAL Gt4; Gt5 = Isolat BAL Gt5; Gt6 = Isolat BAL Gt6).

**Tabel 1.** Perbandingan spesies BAL dari fermentasi singkong (gatot) berdasarkan hasil BLAST dengan hasil identifikasi

Nama Isolat	Homology	Hasil BLAST	Pengelompokkan Berdasarkan Satuan Gen 16s rRNA (Menurut Kriteria Stackebrandt dan Goebel, 1995)
BAL Gt1	96%	<i>Enterococcus durans</i> JCM 8725 strain	<i>Enterococcus</i> sp. FTBUAJY04
BAL Gt2	95%	<i>Enterococcus durans</i> JCM 8725 strain	<i>Enterococcus</i> sp. FTBUAJY05
BAL Gt3	96%	<i>Enterococcus durans</i> JCM 8725 strain	<i>Enterococcus</i> sp. FTBUAJY06
BAL Gt4	99%	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO 604 strain	<i>Lactococcus lactis</i> strain FTBUAJY01
BAL Gt5	99%	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933 strain	<i>Lactococcus lactis</i> strain FTBUAJY02
BAL Gt6	99%	<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 100933 strain	<i>Lactococcus lactis</i> strain FTBUAJY03

Sementara itu, berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa isolat BAL Gt1, BAL Gt2 dan BAL Gt3, dianggap memiliki spesies yang berbeda dengan *Enterococcus durans* karena memiliki homologi berturut-turut adalah 96%, 95%, dan 96%, sedangkan isolat BAL Gt4, BAL Gt5 dan BAL Gt6 memiliki

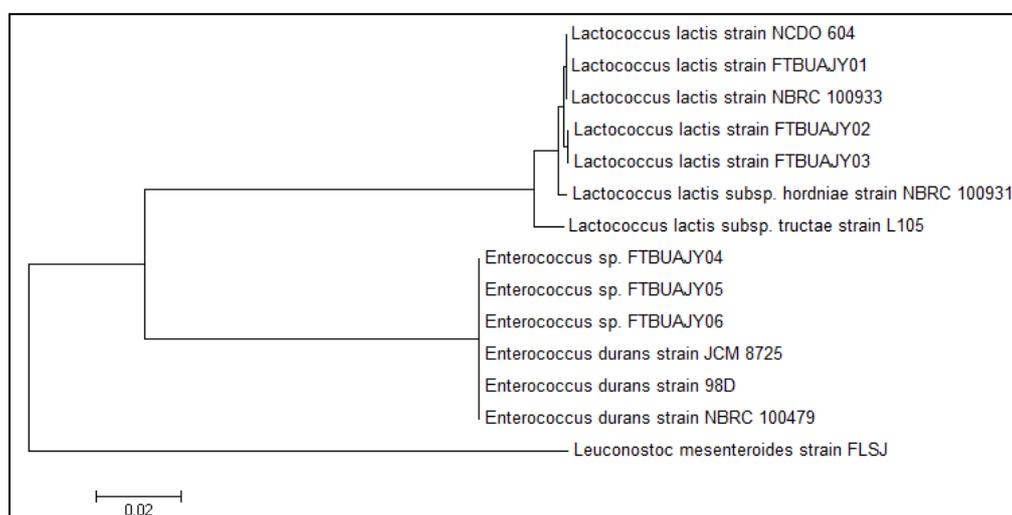
spesies yang sama dengan *Lactococcus lactis* tetapi memiliki strain yang berbeda.

Hasil konstruksi pohon filogeni (Gambar 3) menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok besar yang berasal dari genus *Enterococcus* dan *Lactococcus*. Kedua genus ini memiliki nenek moyang yang sama

kemudian berevolusi. *Enterococcus* sp. FTBUAJY04, *Enterococcus* sp. FTBUAJY05, *Enterococcus* sp. FTBUAJY06 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Enterococcus durans* strain JCM 8725. Spesies *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY01 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactococcus lactis* strain NCDO 604, sedangkan spesies *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY02 dan *Lactococcus lactis* strain FTBUAJY03 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactococcus lactis* strain NBRC 100933.

Beberapa BAL yang ditemukan pada makanan tinggi pati berupa fermentasi

singkong diantaranya adalah *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecium*, *Weissella confusa*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus hilgardii*, dan *Pediococcus acidilactici* (Anyogu *et al.*, 2014). Sehingga dapat diketahui bahwa BAL yang diidentifikasi dalam penelitian ini merupakan salah satu penemuan baru karena selama ini belum ada BAL tersebut yang ditemukan dalam Gatot maupun produk fermentasi singkong.



Gambar 3. Pohon filogeni isolat BAL gatot

### Uji Zona Hambat

Supernatan BAL dari gatot digunakan untuk uji zona hambat terhadap bakteri *B. cereus* dan kapang *A. flavus*. Hasil luas zona hambat yang diperoleh, dianalisis dengan

menggunakan ANAVA pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil luas zona hambat terhadap *B. cereus* dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan hasil luas zona hambat terhadap *A. flavus* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Luas Zona Hambat isolat BAL dari fermentasi singkong (gatot) terhadap *Bacillus cereus* (cm<sup>2</sup>)

Isolat BAL	Luas Zona Hambat
BAL Gt1	1,64 ± 0,88 <sup>x</sup>
BAL Gt2	1,77 ± 0,84 <sup>x</sup>
BAL Gt3	1,18 ± 0,48 <sup>x</sup>
BAL Gt4	1,85 ± 0,55 <sup>x</sup>
BAL Gt5	1,87 ± 0,67 <sup>x</sup>
BAL Gt6	1,56 ± 0,5 <sup>x</sup>

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Hasil ANAVA menunjukkan bahwa supernatan isolat BAL Gt1, BAL Gt2, BAL Gt3, BAL Gt4, BAL Gt5 dan BAL Gt6 dapat menghambat *B. cereus*, tetapi luas zona

hambat yang terbentuk antar perlakuan pemberian supernatan BAL Gt1, BAL Gt2, BAL Gt3, BAL Gt4, BAL Gt5 dan BAL Gt6 tidak memiliki hasil yang berbeda nyata.

Supernatan BAL yang memiliki hasil zona hambat paling besar terhadap *B. cereus* yaitu supernatan BAL Gt5 atau supernatan *L. lactis*

strain FTBUAJY02 sebesar  $1,87 \pm 0,67 \text{ cm}^2$  (Tabel 2).

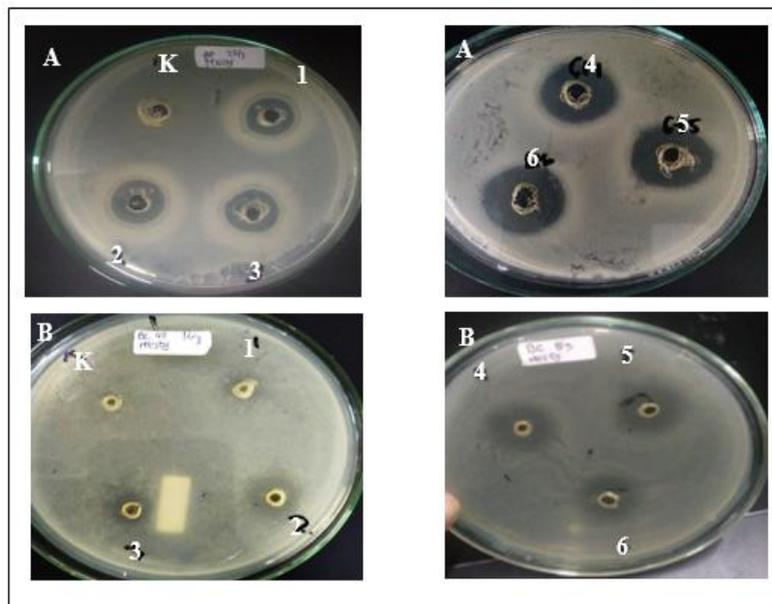
**Tabel 3.** Luas Zona Hambat isolat BAL dari fermentasi singkong (gatot) terhadap *Aspergillus flavus* (cm<sup>2</sup>)

Isolat BAL	Luas Zona Hambat
BAL Gt1	$1,48 \pm 0^x$
BAL Gt2	$1,74 \pm 0,41^x$
BAL Gt3	$1,35 \pm 0,27^x$
BAL Gt4	$3,34 \pm 0,65^y$
BAL Gt5	$3,68 \pm 0,63^y$
BAL Gt6	$3,83 \pm 0,73^y$

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Hasil ANAVA luas zona hambat pada *A. flavus* menunjukkan bahwa supernatan isolat BAL Gt1, BAL Gt2, BAL Gt3, BAL Gt4, BAL Gt5 dan BAL Gt6 dapat menghambat *A. flavus* secara signifikan. Selain itu, antar perlakuan pemberian supernatan BAL Gt1, BAL Gt2 dan BAL Gt3 juga memiliki hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan pemberian supernatan BAL Gt4, Gt5 dan Gt6. Supernatan BAL yang memiliki hasil zona hambat paling besar

terhadap *A. flavus* yaitu supernatan BAL Gt6 atau supernatan *L. lactis* strain FTBUAJY03 sebesar  $3,83 \pm 0,73 \text{ cm}^2$  (Tabel 3). Oleh sebab itu, dapat dikatakan bahwa supernatan BAL Gt6 paling baik dan efektif dalam menghambat *A. flavus* dibandingkan supernatan isolat BAL Gt1, BAL Gt2, BAL Gt3, BAL Gt4, maupun BAL Gt5. Hasil uji zona hambat dari supernatan BAL terhadap *B. cereus* dan *A. flavus* dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Hasil uji zona hambat supernatan isolat BAL dari fermentasi singkong (gatot) terhadap *A. flavus* (A) dan *B. cereus* (B) dengan waktu inkubasi 24 jam : K) kontrol yaitu MRSB; 1) isolat BAL Gt1; 2) isolat BAL Gt2; 3) isolat BAL Gt3; 4) isolat BAL Gt4; 5) isolat BAL Gt5; 6) isolat BAL Gt6.

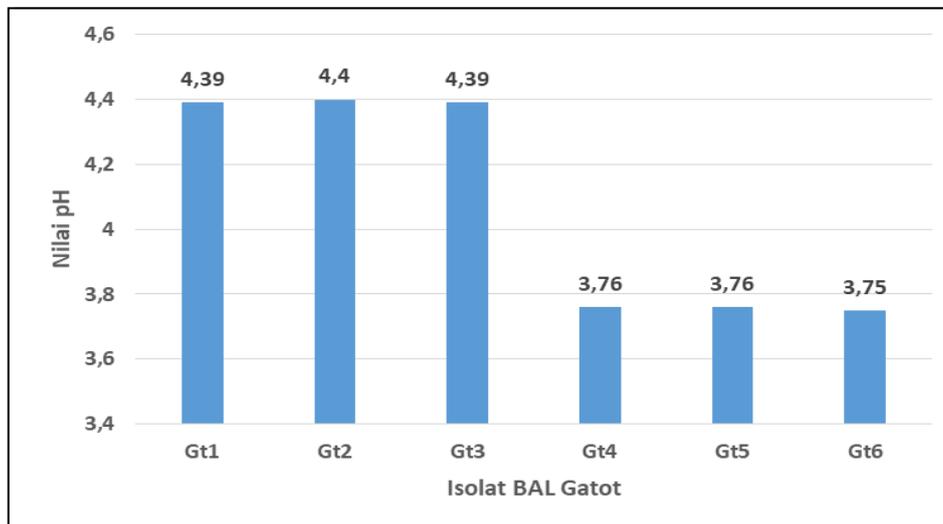
Berdasarkan teori menurut Anyogu et al. (2014) mengenai kategori kemampuan penghambatan berdasarkan diameter zona bening maka dapat diketahui bahwa supernatan BAL Gt1, BAL Gt2, BAL Gt3, BAL Gt4, BAL

Gt5 dan BAL Gt6 memiliki kemampuan menghambat yang sangat kuat terhadap *B. cereus* maupun *A. flavus*. Kemampuan penghambatan supernatan BAL terhadap *B. cereus* maupun *A. flavus* dapat dikatakan

sangat kuat karena memiliki diameter zona bening lebih dari 4 mm. Rata-rata diameter zona bening dihitung dengan cara rata-rata diameter zona bening yang diukur dengan penggaris dikurangi diameter sumuran. Hasil diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari supernatan isolat BAL Gt5 terhadap *B. cereus* adalah  $1,1 \pm 0,26$  cm atau 11 mm, sedangkan diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari supernatan isolat BAL Gt6 terhadap *A. flavus* adalah  $1,68 \pm 0,2$  cm atau 16,8 mm.

Besarnya luas zona hambat yang terbentuk disebabkan oleh adanya beberapa

komponen antimikrobia yang dihasilkan oleh BAL. Salah satu komponen utama yang dihasilkan BAL adalah asam laktat. BAL jenis heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga dapat menghasilkan asam organik lainnya, hidrogen peroksida dan bakteriosin (Widodo, 2017). Oleh sebab itu, banyaknya asam laktat serta asam organik lainnya yang dihasilkan dapat mempengaruhi nilai pH supernatan BAL. Hasil pengukuran pH dari supernatan BAL yang digunakan untuk uji zona hambat dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil pengukuran pH pada supernatan BAL dari fermentasi singkong (gatot): Gt1= *Enterococcus* sp. FTBUAJY04; Gt2= *Enterococcus* sp. FTBUAJY05; Gt3= *Enterococcus* sp. FTBUAJY06; Gt4) *L. lactis* strain FTBUAJY01; Gt5 = *L. lactis* strain FTBUAJY02; Gt6 = *L. lactis* strain FTBUAJY03)

Menurut Damayanti *et al.* (2015) hasil metabolit BAL berupa asam asetat dan asam laktat dapat menghambat pertumbuhan kapang *A. flavus*. Hal ini terjadi karena adanya penurunan pH medium yang menyebabkan degradasi dinding sel sehingga asam berpenetrasi dalam bentuk tidak terdisosiasi. Setiap BAL memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan senyawa antimikrobia dan kecepatan disosiasi ini tergantung pada pH. Senyawa antimikrobia dari BAL yang memiliki pH yang rendah dalam bentuk tidak terdisosiasi akan lebih mudah melewati membran sel sehingga akan terakumulasi pada sitoplasma. Akibat dari adanya senyawa antimikrobia yang terakumulasi di sitoplasma menyebabkan sel

menjadi rusak dan kehilangan viabilitas (Gerez *et al.*, 2009).

Komponen utama yang dapat menghambat pertumbuhan kapang dalam penelitian ini belum dapat diketahui secara pasti. Namun, ada beberapa penelitian yang menyebutkan bahwa BAL dapat menghasilkan enzim kitinase dan glukonase yang dapat mendegradasi kitin dan menghidrolisis glukon sehingga dapat menyebabkan lisis sel karena kitin dan glukon merupakan komponen dinding sel dari fungi (Nautiyal & Dion, 2008). Penelitian lain menyebutkan bahwa senyawa asam organik, dan senyawa yang memiliki berat molekul rendah atau kurang dari 1000 Da yang dihasilkan oleh BAL dapat berperan sebagai senyawa antijamur (Yang & Chang, 2010). Selain itu, bakteriosin juga memiliki

pengaruh dalam menghambat pertumbuhan *B. cereus* dan *A. flavus*. *Enterococcus* sp. dapat menghasilkan bakteriosin berupa Enterocin (Du et al., 2017). *Lactococcus lactis* dapat menghasilkan bakteriosin berupa Lactococcin (Attar et al., 2018). Mekanisme kerja bakteriosin dalam membunuh mikrobia adalah dengan terikat pada membran fosfolipid bilayer yang bermuatan negatif karena bakteriosin bersifat kationik. Interaksi antara bagian hidrofobik bakteriosin dengan membran lipid bakteri akan menghasilkan saluran ionik sehingga terbentuk pori yang akan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler yaitu berupa ion, ATP, dan protein. Bakteriosin selanjutnya akan masuk ke bagian dalam mikroba dan dapat menghambat enzim yang bekerja, selain itu juga dapat mengganggu biosintesis dinding sel sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Bharti et al., 2015).

## Simpulan

Spesies BAL yang terdapat dalam gatot matang adalah *Enterococcus* sp. FTBUAJY04, *Enterococcus* sp. FTBUAJY05, dan *Enterococcus* sp. FTBUAJY06, sedangkan spesies BAL yang terdapat pada gatot mentah adalah *L. lactis* strain FTBUAJY01, *L. lactis* strain FTBUAJY02, dan *L. lactis* strain FTBUAJY03. Supernatan BAL yang memiliki luas zona hambat paling besar terhadap *B. cereus* yaitu supernatan *L. lactis* strain FTBUAJY02 sebesar  $1,87 \pm 0,67$  cm<sup>2</sup>. Supernatan BAL yang memiliki luas zona hambat paling besar terhadap *A. flavus* yaitu supernatan *L. lactis* strain FTBUAJY03 sebesar  $3,83 \pm 0,73$  cm<sup>2</sup>. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL tersebut sebagai biopreservatif pada pangan tinggi karbohidrat.

## Daftar Pustaka

- Abel, E. E., Poonga, P. R. J. dan Panicker, S.G. (2014). Effects of different solvent extracts of *Cassia tora* leaves against Gram positive bacteria. *International Journal of Pharmacy and Life Science* 5(4): 3436–3439
- Anyogu, A., Awamaria, B., Sutherland, J. P. dan Ouoba, L.I.I. (2014). Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. *Food Control* 39: 119–127.
- Adiyanto, O. (2015). Efektifitas pestisida (tolfenpyrad, pyrydaben, fluacrypyrim, dan boscalid) sebagai penghambat pertumbuhan jamur dan produksi aflatoxin b1 pada kacang tanah (*Arachis hypogaeae* L.). Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Attar, M. A., Yavarmanesh, M., Mortazavi, A., Dovom, M. R. E. dan Najafi, M.B.H. (2018). Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from Lighvan cheese regarding the recognition of Nisin, Lacticin and Lactococcin structural genes. *Food Science and Technology* 89: 186–191.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2014). Keracunan Pangan Akibat Bakteri Patogen. <http://ik.pom.go.id/v2014/artikel/Keracunan-Pangan-AkibatBakteri-Patogen3.pdf>. Diakses pada 22 Maret 201
- Bharti, V., Singh, S. dan Ahirwal, L. (2015). Bacteriocin: A novel approach for preservation of food Innovare. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(9): 20-29 .
- Damayanti, E., Suryani, A. E., Sofyan, A., Karimy, M. F. dan Julendra, H. (2015). Seleksi bakteri asam laktat dengan aktivitas anti jamur yang diisolasi dari silase dan saluran cerna ternak. *Agritech* 35(2): 164–169.
- Du, L., Liu, F., Zhao, P. dan Doyle, M. P. (2017). Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. *Food Microbiology* 68:97–103.
- Gasperz, V. (1991). *Metode Perancangan Percobaan*. Armico, Bandung.
- Gerez, C. L., Torino, M. L., Rollan, G. dan de Valdez, G.F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20(2): 144–148.
- Keramas, G., Bang, D., Lund, M., Madsen, M., Bunkenborg, H., Tellemen, P. dan Christensen, C. (2004). Use of culture, PCR analysis and DNA microarrays for

- detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken faeces. *Journal Clinical Microbiology* (47): 3985-3991
- Lestari, L. A., Lestari, P. M. dan Utami, F.A. (2014). *Kandungan Zat Gizi Makanan Khas Yogyakarta*. UGM Press, Yogyakarta.
- Magistrado, P., Carcia, M. dan Raymundo, A. (2001). Isolation and polymerase chain reaction base detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Philippines. *International Journal Food Microbiology* (70): 194-206.
- Malik, A., Hermawati, A. K., Hestingtyas, M., Soemiati, A. dan Radji, M. (2010). Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukansukrase dari makanan dan minuman mengandung gula. *Makara Sains* 14(1): 63–68.
- Nanasombat, S., Phunpruch, S., dan Jaichalad, T. (2012). Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafood and Thai fermented seafood products for their potential use as starter cultures. *Journal Science Technology* 34(3): 255-262.
- Nautiyal, C. S. dan Dion, P. (2008). *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. Springer-Verlag, Berlin.
- Nurhayati, Jenie, B. S. L., Kusumaningrum, H. D. dan Widowati, S. 2011. Identifikasi fenotipik dan genotipik bakteri asam laktat asal fermentasi spontan pisang var. Agung semeru (*Musa paradisiaca formatypica*). *Jurnal Ilmu Dasar* 12(2): 210–215.
- Oramahi, H. A. (2006). Identifikasi jamur genus *Aspergillus* pada gaplek di Kabupaten Gunung Kidul. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 12(1): 25–32.
- Pearson, W. R., Robins, G. dan Zhang, T. (1999). Generalized neighbor-joining: more reliable phylogenetic tree reconstruction. *Molecular Biology Evolution* 16(6): 806–816.
- Purwijantingsih, E. (2011). Uji antibakteri yoghurt sinbiotik terhadap beberapa patogen enterik. *Jurnal Biota* 16 (2): 173-177.
- Putri, W. D. R., Haryadi, Marseno, D. W. dan Cahyanto, M. N. (2012). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat amilolitik selama fermentasi growol, makanan tradisional Indonesia. *Jurnal Teknologi Pertanian* 13(1): 52–60.
- Rahayu, E. S. (2003). Lactic acid bacteria fermented foods of Indonesian origin. *Agritech* 23(2):75-84.
- Saad, S. M., Vanzin, C., Oliveira, M. N. dan Franco, B.D. (2001). Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated Minas cheese during storage at 8.5 degrees C. *Journal of Food Protection* 64(8): 1151–1155.
- Samboja, L.D.G., Purwijantingsih, E. dan Yuda, P. (2011). Identifikasi dan uji aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari fermentasi udang (cincalok) terhadap *Vibrio parahaemolyticus* dan *Listeria monocytogenes*. *JFLS* 3(1): 11-20
- Stackebrandt, E. dan Goebel, B.M. (1995). A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846–849.
- Widodo. (2017). *Bakteri Asam Laktat Strain Lokal: Isolasi Sampai Aplikasi Sebagai Probiotik dan Starter Fermentasi Susu*. UGM Press, Yogyakarta.
- Yang, E. J., dan Chang, H. C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Journal of Food Microbiology* 139: 56–63.