



Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Susu Sapi di Indonesia

Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cow's Milk in Indonesia

Michell Suphandi¹, Marcelia Sugata^{1*}, Tan Tjie Jan¹

¹Program Studi Biologi, Universitas Pelita Harapan

Jl. M.H. Thamrin Boulevard, Lippo Village, Tangerang 15811, Indonesia

Email: marcelia.sugata@uph.edu

*Penulis Korespondensi

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are known to have the potential to inhibit the growth of pathogenic bacteria. In this study, LAB isolated from cow's milk in Indonesia was identified through morphological observation and molecular analysis. Morphological observation included Gram and endospores staining. Molecular identification was carried out through DNA extraction, 16S rRNA gene amplification using universal primers, sequencing, and BLAST analysis. Antibacterial activity test of cell free supernatant (CFS) produced by the isolate was carried out using well diffusion method. Furthermore, the effect of temperature and pH on the antibacterial activity of CFS was evaluated. Based on morphological observation, the isolate was rod-shaped, Gram positive, and non-spore-forming bacteria. The results of 16S rRNA analysis showed that the isolates had a close relationship with *L. paracasei* strain L1 (100%) and *L. casei* strain WX121 (99.84%). Antibacterial activity test showed that the isolate was able to inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus*. The inhibitory activity was affected by pH, but not by temperature. The best inhibitory activity was shown by CFS with a very low pH (pH 3). Temperature did not affect the antibacterial activity because the antibacterial compounds produced by the isolate might be resistant to heat.

Keywords: cell free supernatant, *L. casei*, *L. paracasei*, molecular identification, well diffusion method

Abstrak

Bakteri asam laktat (BAL) diketahui memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Pada penelitian ini, BAL yang diisolasi dari susu sapi di Indonesia diidentifikasi melalui pengamatan morfologi dan analisis molekuler. Pengamatan morfologi meliputi pewarnaan Gram dan endospora. Selanjutnya, identifikasi molekuler dilakukan dengan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal, sekuensing dan analisis BLAST. Uji aktivitas antibakteri dari *cell free supernatant* (CFS) yang dihasilkan isolat dilakukan dengan metode sumuran. Selain itu, dilakukan juga evaluasi terkait pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas antibakteri dari CFS. Berdasarkan pengamatan morfologi, isolat merupakan bakteri berbentuk batang, Gram positif, tidak menghasilkan endospora, dan tidak termasuk bakteri *acid-fast*. Hasil analisis 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat memiliki kekerabatan yang erat dengan *L. paracasei* strain L1 (100%) dan *L. casei* strain WX121 (99,84%). Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa isolat mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*. Aktivitas penghambatan tersebut dipengaruhi oleh pH, tetapi tidak oleh suhu. Aktivitas penghambatan terbaik ditunjukkan oleh CFS dengan pH yang sangat rendah (pH 3). Suhu tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri karena senyawa antibakteri yang dihasilkan isolat kemungkinan besar tahan terhadap panas.

Kata kunci: identifikasi molekuler, *L. casei*, *L. paracasei*, metode sumuran, supernatan

Diterima: 12 November 2022, direvisi : 30 November 2022, disetujui: 10 Desember 2022



Pendahuluan

Susu sapi merupakan salah satu produk hasil ternak dengan konsumsi global yang tinggi. Susu sapi mengandung berbagai nutrisi esensial seperti lemak, protein, laktosa, serta vitamin dan mineral yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh manusia (Robinson, 2019). Adanya kandungan laktosa dalam susu sapi menjadikannya kaya akan bakteri yang dapat memanfaatkan laktosa sebagai sumber energi utama dan menghasilkan asam laktat. Bakteri tersebut seringkali disebut sebagai bakteri asam laktat (BAL) (Colombo *et al.*, 2018). BAL terdiri dari empat genus bakteri utama, yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. Selain itu, terdapat juga beberapa genus BAL lainnya seperti *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weisella* (Mozzi, 2016).

Bakteri asam laktat memiliki beberapa karakteristik yaitu merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang atau kokus, tidak menghasilkan spora, katalase negatif, serta menghasilkan asam laktat dari hasil fermentasi laktosa (Ismail *et al.*, 2018). BAL diketahui dapat menghasilkan asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan senyawa lainnya (Gupta *et al.*, 2018). BAL juga mampu memproduksi senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen (Febriana *et al.*, 2021). Spesies BAL seperti *Lactobacillus* dilaporkan memiliki efek antagonis terhadap *E. coli* dan *S. aureus* (Ren *et al.*, 2018). Walaupun *E. coli* merupakan mikroflora normal pada manusia, beberapa strain *E. coli* bersifat patogen sehingga dapat menyebabkan penyakit, seperti diare (World Health Organization, 2018). Umumnya *E. coli* dapat ditularkan melalui air atau makanan yang terkontaminasi. *S. aureus* adalah bakteri Gram-positif yang merupakan flora normal di bagian hidung dan kulit manusia. Umumnya *S. aureus* tidak menyebabkan penyakit pada orang sehat, tetapi memiliki kemampuan untuk menghasilkan racun yang dapat menyebabkan keracunan makanan. Keracunan makanan *S. aureus* mengakibatkan mual, muntah, dan kram perut yang tiba-tiba hingga diare (Centers for Disease Control and Prevention, 2018).

Pada penelitian ini, isolat BAL yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Rizkinata

et al., 2018) diidentifikasi melalui pengamatan morfologi dan secara molekuler berdasarkan sekuens gen 16S rRNA. Kemampuan isolat untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen diuji terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Selain itu, dilakukan pula evaluasi mengenai pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas antimikroba dari isolat.

Metode Penelitian

Isolat dan kondisi kultur

Isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu bakteri hasil isolasi dari susu sapi di Indonesia yang dilakukan oleh Rizkinata *et al.* (2018). Isolat disimpan dalam bentuk kultur cair di *microtube* 1,5 ml steril berisi medium MRS cair dan gliserol 20% (v/v) sebagai krioprotektan. Penyimpanan dilakukan pada suhu -40°C . Saat akan digunakan, stok kultur isolat diinokulasi secara aseptik pada medium MRS agar (Merck, Jerman) dengan metode gores. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dengan kondisi mikroaerofilik. Koloni yang tumbuh dipurifikasi dengan metode *four-way streak* pada medium MRS agar yang baru, lalu diinkubasi kembali. Selanjutnya, dilakukan pengamatan morfologi koloni dan pemilihan koloni tunggal untuk digunakan pada tahapan selanjutnya, yaitu identifikasi dan pengujian aktivitas antimikroba dari isolat BAL.

Pengamatan morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan dengan melakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora (Cappuccino & Welsh, 2019). Isolat diinokulasikan ke dalam tetesan air pada kaca preparat. Tetesan air berisi isolat dikeringkan dan difiksasi di atas api hingga terbentuk apusan kering. Pada pewarnaan Gram, apusan ditetesi dengan pewarna kristal violet dan didiamkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan air. Setelah itu, larutan iodin ditetaskan dan dibiarkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya, apusan dibilas dengan dekoloran dan ditetesi safranin. Setelah dibiarkan selama 30 detik, apusan dibilas dengan air dan dikeringkan. Pada pewarnaan endospora, apusan ditetesi dengan pewarna malakit hijau lalu didiamkan selama 5 menit di atas pemanas air dan dijaga agar tidak kering. Selanjutnya, malakit hijau dibilas dengan air

dan apusan ditetesi dengan safranin. Setelah dibiarkan selama satu menit, apusan dibilas dengan air dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi.

Uji katalase

Uji aktivitas katalase dilakukan berdasarkan metode dari Mulaw *et al.* (2019). Kaca preparat yang telah ditetesi air disiapkan terlebih dahulu. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tetesan air tersebut lalu ditetesi hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%. Pengamatan dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya produksi gelembung. Adanya gelembung menandakan adanya aktivitas katalase.

Identifikasi molekuler

Tahapan identifikasi molekuler meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan metode PCR, visualisasi, serta sekuensing yang dilakukan oleh PT Genetika Science Indonesia. Tahapan ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, USA). Hasil ekstraksi dikuantifikasi dengan BioDrop DUO UV/Vis spectrophotometer (BioDrop, UK) dan digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR. Tahapan PCR dilakukan menggunakan MyTaq HS Red Mix (Bioline, USA) dengan primer universal 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (IDT Inc., Singapore) dan 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (IDT Inc., Singapore) dalam 50 µL total volume per reaksi. Visualisasi dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarose 0,8% yang dijalankan pada kondisi 100 Volt selama 20 menit dengan DNA ladder 1 kb (Bioline, USA). Setelah proses selesai, agarose direndam dalam larutan Ethidium Bromide (EtBr) tanpa terkena cahaya selama 15 menit, lalu pengamatan dilakukan di bawah sinar UV. Hasil amplifikasi DNA dengan kualitas yang baik dikirimkan untuk disekuens oleh 1st BASE Laboratories Pte. Ltd., Malaysia. Sekuens parsial gen 16S rRNA dari isolat diproses menggunakan Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems, USA) dan perangkat lunak BioEdit (Ibis Therapeutics, USA). Urutan 16S rRNA yang diperoleh dicocokkan dengan database NCBI GenBank menggunakan algoritma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> Blast.cgi). Analisis jarak evolusiner antara isolat BAL

dengan spesies terkait dilakukan berdasarkan pohon filogenetik yang dikonstruksi menggunakan sekuens gen 16S rRNA. Program MEGA.X dengan metode *Maximum Likelihood* dan nilai *bootstrap* pada 1000 ulangan digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik.

Persiapan *cell-free supernatant* (CFS)

Persiapan *cell-free supernatant* (CFS) dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam medium MRS cair (Arena *et al.*, 2016) pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kondisi mikroaerofilik. Selanjutnya, kultur cair dipindahkan sebanyak 1% ke dalam MRS cair (Merck, Jerman) steril dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kondisi mikroaerofilik. Kultur cair disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dan disaring dengan filter nilon 0,45 µm steril, lalu disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

Uji aktivitas antibakteri dengan metode sumuran

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode sumuran (Ren *et al.*, 2018). Sebelum pengujian, CFS diberi perlakuan pH dan suhu terlebih dahulu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas antibakteri diuji dengan memanaskan CFS pada suhu 65, 80 dan 100°C selama 30 menit, serta pada suhu 121°C selama 15 menit. Sementara itu, pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri diuji dengan mengatur pH CFS menjadi 2, 4, 5, 6, dan 7 dengan 1 M NaOH dan 1 M HCl. CFS yang telah diberi perlakuan suhu dan pH diinkubasi selama satu jam pada suhu 30°C. Setelah inkubasi, CFS dimasukkan sebanyak 50 µl ke dalam medium Nutrient Agar (NA; Merck, Jerman) yang telah dilubangi dan diinokulasikan dengan bakteri patogen menggunakan metode *swab*. MRSB sebagai kontrol negatif dimasukkan sebanyak 50 µl, sedangkan ampicillin sebagai kontrol positif dimasukkan sebanyak 4 µl. NA berisi CFS diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar lubang.

Analisis statistik

Data dari pengujian aktivitas antimikroba berupa ukuran diameter zona hambat diolah secara statistik (n=3) dengan Analysis of Variance (ANOVA) menggunakan Minitab 15 (Minitab Inc., USA). Nilai p-value

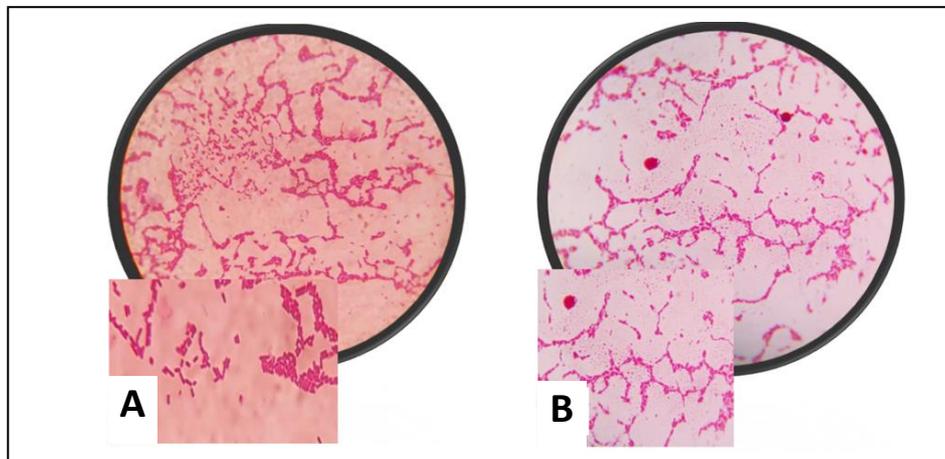
< 0,05 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik

Hasil dan Pembahasan

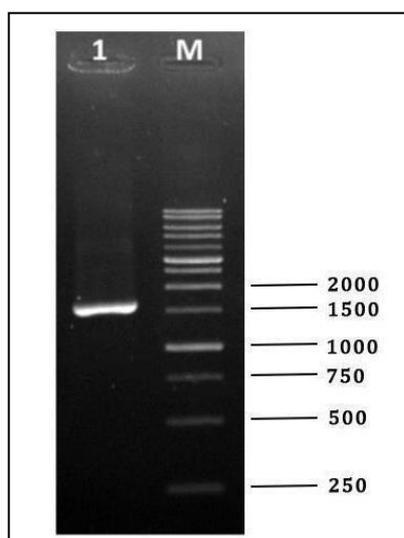
Pengamatan morfologi dan uji aktivitas katalase

Isolat BAL yang ditumbuhkan pada medium MRS agar menunjukkan morfologi koloni dengan ciri-ciri berwarna putih, berbentuk bulat, elevasi *convex*, margin *entire*, dan berukuran sedang (data tidak ditampilkan).

Morfologi tersebut sesuai dengan deskripsi Bratcher (2018) mengenai koloni dari spesies *Lactobacillus*. Selanjutnya, pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Berdasarkan Gambar 1, dapat disimpulkan bahwa isolat BAL merupakan bakteri berbentuk batang, Gram positif, dan tidak menghasilkan endospora. Selain itu, uji katalase menunjukkan bahwa isolat tidak menghasilkan enzim katalase. Morfologi sel dan karakteristik tersebut sesuai dengan deskripsi Rafieian-Kopaei *et al.* (2017) mengenai spesies *Lactobacillus*.



Gambar 1. Hasil pewarnaan dari isolat BAL: A) pewarnaan Gram dan B) pewarnaan endospora.



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan agarose 0,8% yang dijalankan pada kondisi 100 Volt selama 20 menit. Keterangan: 1 = hasil PCR; M = DNA ladder 1 kb

Analisis molekuler

Identifikasi molekuler isolat BAL dilakukan dengan mengampifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal. Visualisasi hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil visualisasi, amplifikasi gen 16S rRNA menghasilkan *band* berukuran 1500 bp yang jelas sehingga sampel dapat dikirimkan untuk disekuens.

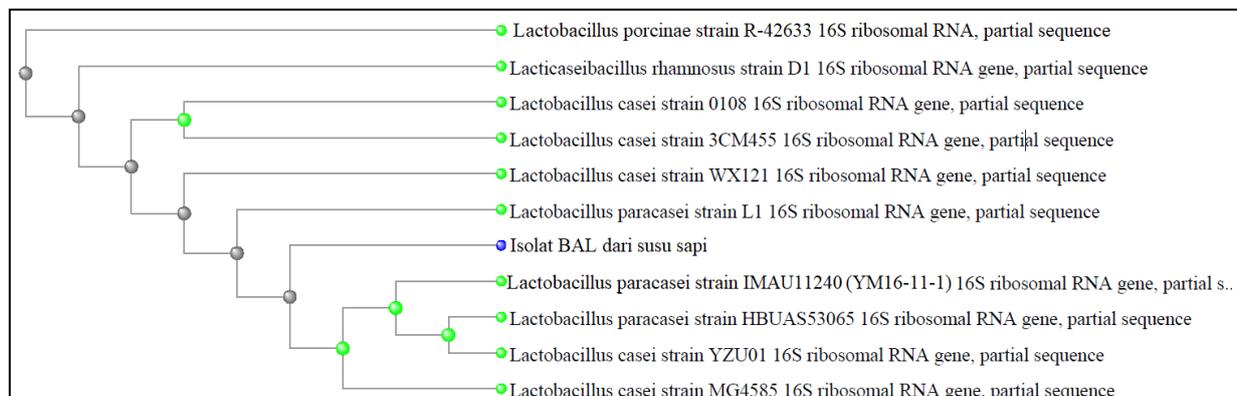
Hasil sekuensing yang diperoleh selanjutnya diproses dan dicocokkan dengan bakteri yang ada pada database NCBI GenBank menggunakan algoritma BLAST. Jika identifikasi mikroorganisme dilakukan berdasarkan 16S rRNA, maka mikroorganisme dikatakan merupakan spesies yang sama jika memiliki nilai *percent identity* di atas 98,6% (Madigan et al., 2022).

Hasil BLAST pada Gambar 3 dan pohon filogenetik pada Gambar 4 menunjukkan bahwa urutan nukleotida 16S rRNA dari isolat BAL yang berasal dari susu sapi memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Lactobacillus paracasei*

strain L1 (100%) dan *Lactobacillus casei* strain WX121 (99,84%). *L. casei* dan *L. paracasei* memang memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, baik secara fenotip maupun genotip. Tingkat kemiripan yang tinggi (99%) pada sekuens gen 16S rRNA antar spesies *L. casei* dan *L. paracasei* menyebabkan kedua spesies tersebut seringkali sulit dibedakan. Walaupun uji fenotipik dapat diterapkan untuk menentukan karakteristik metabolik dari masing-masing spesies/strain, namun grup *L. casei* dan *L. paracasei* memiliki keanekaragaman karakteristik yang menghasilkan beraneka ragam fenotip. Keanekaragaman dalam fenotip ini dapat dipengaruhi oleh penambahan atau penyusutan plasmid yang mengkodekan sejumlah karakter, misalnya kemampuan fermentasi karbohidrat (Huang et al., 2018). Resolusi yang lebih tinggi dalam membedakan kedua spesies tersebut dapat dicapai dengan melakukan *housekeeping sequence* dengan disertai teknik tambahan seperti SNaPshot *minisequencing*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus paracasei strain L1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus paracasei	1146	1146	100%	0.0	100.00%	1500	MT791336.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus paracasei strain HBUAS53065 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus paracasei	1140	1140	100%	0.0	99.84%	1489	MH393140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain WX121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus casei	1140	1140	100%	0.0	99.84%	1483	JQ046406.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain 0108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus casei	1140	1140	100%	0.0	99.84%	1456	JN560887.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain MG4585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus casei	1138	1138	100%	0.0	99.84%	1427	MN833023.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus paracasei strain IMAU11240 (YM16-11-1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus paracasei	1138	1138	100%	0.0	99.84%	1445	KP764184.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain YZU01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus casei	1129	1129	100%	0.0	99.52%	1472	MK951980.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus casei strain 3CM455 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus casei	1105	1105	100%	0.0	98.72%	1464	MK559722.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus rhamnosus strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus rhamnosus	1027	1027	89%	0.0	100.00%	1318	MT474053.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus porciniae strain R-42633 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactobacillus porciniae	987	987	100%	0.0	95.32%	1507	NR_108876.1

Gambar 3. Hasil analisis BLAST dari isolat BAL yang berasal dari susu sapi di Indonesia

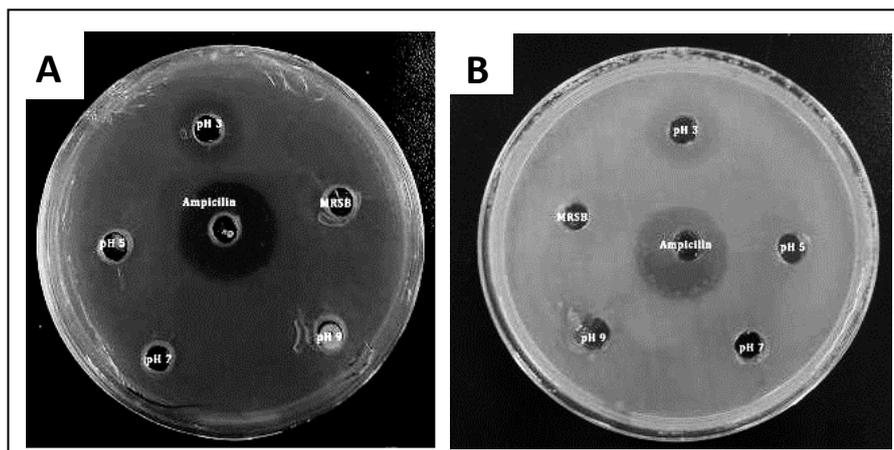


Gambar 4. Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan sekuens gen 16S rRNA menggunakan metode *Maximum Likelihood* menunjukkan posisi isolat BAL dari susu sapi di Indonesia di antara species *Lactobacillus* terkait.

Pengaruh pH terhadap aktivitas antimikroba isolat BAL

Hasil uji aktivitas antimikroba dari CFS isolat BAL yang telah diberi berbagai perlakuan pH dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 1. Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *S. aureus* hanya ditunjukkan oleh CFS dengan pH 3. Spesies *Lactobacillus* umumnya menghasilkan komponen seperti asam organik (terutama asam laktat dan asam asetat), hidrogen peroksida, serta bakteriosin yang diduga berperan sebagai agen antibakteri. Pada umumnya, produksi asam organik dan penurunan pH lingkungan merupakan mekanisme utama dari aktivitas antimikroba BAL. Meskipun asam organik yang dihasilkan BAL termasuk asam lemah sehingga tidak terdisosiasi sepenuhnya di dalam

air, tetapi pada pH tertentu asam organik dapat terdisosiasi sepenuhnya di dalam air (*pH-dependent manner*). Dua mekanisme utama dari asam organik sebagai agen antimikroba, yaitu pengasaman sitoplasma dan akumulasi anion asam yang terdisosiasi hingga mencapai level toksik. Asam organik yang tidak terdisosiasi dapat masuk ke dalam sel bakteri dan berdisosiasi di dalam sitoplasma. Penurunan pH intraseluler serta akumulasi asam organik dalam bentuk ionisasi di sitoplasma dapat menyebabkan kematian bakteri patogen (Hu *et al.*, 2019). Oleh karena itu, nilai pH yang semakin mendekati netral menurunkan kemungkinan terjadinya pengasaman sitoplasma dan akumulasi anion asam sehingga menyebabkan aktivitas antibakteri semakin menurun (Noroozi *et al.*, 2019).



Gambar 5. Hasil uji aktivitas antibakteri dari CFS isolat BAL yang telah diberi berbagai perlakuan pH terhadap bakteri uji: A) *E. coli*; B) *S. aureus*

Tabel 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas antimikroba isolat BAL

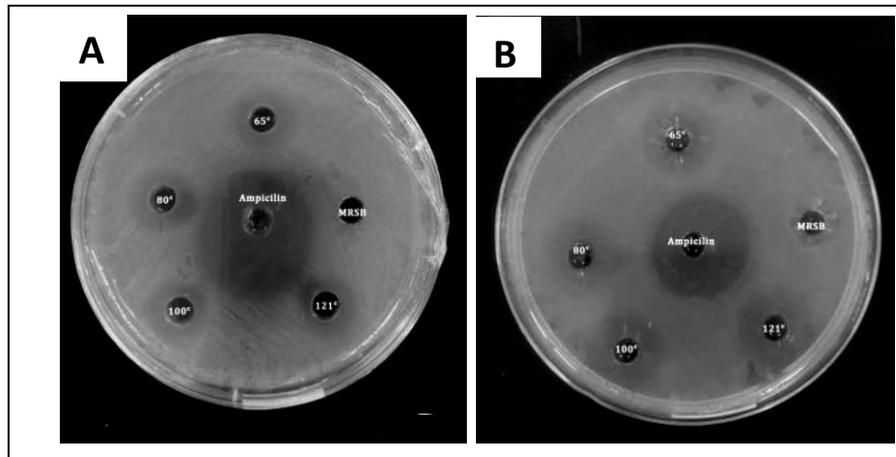
Bakteri uji	Ukuran zona hambat (cm)					
	pH 3	pH5	pH 7	pH 9	MRS	Ampicillin
<i>Escherichia coli</i>	0,97 ± 0,06 ^a	0	0	0	0	1,55 ± 0,21 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,03 ± 0,15 ^A	0	0	0	0	2,30 ± 0,01 ^B

Keterangan: Data telah dikurangi dengan diameter lubang sebesar 0,6 cm. Data dinyatakan dalam rata-rata ± standar deviasi (n=3). Alfabet berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (p-value < 0,05).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas antimikroba isolat BAL

Hasil uji aktivitas antimikroba dari CFS isolat BAL yang telah diberi berbagai perlakuan suhu dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 2. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ukuran zona bening yang dihasilkan oleh CFS yang diberi berbagai perlakuan suhu tidak berbeda secara signifikan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa suhu tidak mempengaruhi aktivitas antimikroba dari CFS isolat BAL, baik terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. Senyawa antimikroba seperti asam organik umumnya bersifat stabil terhadap panas. Selain itu, diduga terdapat aktivitas antimikroba dari beberapa molekul lain dengan sifat tahan panas

yang dihasilkan oleh isolat BAL. Menurut Ibrahim et al. (2021), agen antimikroba yang sangat efektif digunakan secara sinergis dengan panas adalah hidrogen peroksida (H₂O₂), bahkan aktivitas antimikroba dari H₂O₂ akan lebih kuat bila dikombinasikan dengan panas. Selain itu, bakteriosin yang dihasilkan BAL umumnya bersifat termostabil karena memiliki berat molekul rendah dan struktur sekunder yang mendukung resistensi pada suhu tinggi. Meskipun suatu mikroorganisme dapat memiliki berbagai mekanisme antimikroba, namun hasil uji pengaruh pH terhadap aktivitas antimikroba dari BAL mengindikasikan bahwa asam organik merupakan agen antimikroba utama dari isolat BAL.



Gambar 6. Hasil uji aktivitas antibakteri dari CFS isolat BAL yang telah diberi berbagai perlakuan suhu terhadap bakteri uji: A) *E. coli*; B) *S. aureus*

Tabel 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas antimikroba isolat BAL

Bakteri uji	Ukuran zona hambat (cm)					MRS	Ampicillin
	65 °C	80 °C	100 °C	121 °C			
<i>Escherichia coli</i>	0,60 ± 0,26 ^a	0,77 ± 0,12 ^a	0,63 ± 0,15 ^a	0,63 ± 0,21 ^a		0	1,50 ± 0,28 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,90 ± 0,17 ^A	1,01 ± 0,10 ^A	0,97 ± 0,25 ^A	1,03 ± 0,21 ^A		0	2,15 ± 0,07 ^B

Keterangan: Data telah dikurangi dengan diameter lubang sebesar 0,6 cm. Data dituliskan sebagai rata-rata ± standar deviasi (n=3). Pemanasan CFS pada berbagai suhu dilakukan selama 30 menit, kecuali pada suhu 121°C dilakukan selama 15 menit (autoklaf). Alfabet berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (p-value < 0,05).

Berdasarkan ukuran zona hambat pada Tabel 1 dan Tabel 2, *S. aureus* lebih rentan terhadap CFS isolat BAL dibandingkan *E. coli*. Meskipun demikian, secara statistik ukuran zona hambat antara *E. coli* dan *S. aureus* tidak berbeda signifikan. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Ma et

al. (2020) melaporkan bahwa senyawa antimikroba yang diproduksi oleh BAL *L. casei* KLDS 1.0338 menunjukkan spektrum antimikroba yang luas terhadap bakteri Gram positif dan gram negatif, terutama terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 2592. Pengujian yang dilakukan Ren et al. (2018) juga

menunjukkan bahwa CFS BAL dari makanan fermentasi *homemade* memiliki efek antibakteri yang lebih kuat terhadap *S. aureus* dibandingkan *E. coli*. Bakteri asam laktat yang berbeda menghasilkan substansi antibakteri yang berbeda, sehingga aktivitas penghambatan yang ditunjukkan terhadap patogen pun dapat berbeda-beda. Selain itu, jenis BAL yang berbeda dapat menghasilkan asam organik yang berbeda, bahkan beberapa spesies BAL memproduksi lebih banyak asam asetat dibandingkan asam laktat. *Lactobacillus* sebagai salah satu spesies BAL umumnya menghasilkan lebih dari satu asam organik dan perbedaan proposi asam organik yang dihasilkan kemungkinan dapat menyebabkan aktivitas antimikroba dari BAL menjadi tidak konsisten (Hu *et al.*, 2019). Oleh sebab itu, BAL dengan spesies atau strain yang berbeda dapat menunjukkan aktivitas penghambatan yang berbeda terhadap patogen yang sama.

Hasil yang diperoleh mengindikasikan bahwa aktivitas antimikroba utama dari isolat BAL diduga berasal dari asam organik yang dihasilkan. Meskipun ada kemungkinan aktivitas antimikroba berasal dari molekul lainnya, seperti hidrogen peroksida dan bakteriosin, namun hasil yang diperoleh saat ini belum dapat membuktikan hal tersebut. Pada umumnya, produksi bakteriosin oleh BAL terbilang sangat rendah dibandingkan produksi asam organik. Meng *et al.* (2016) melaporkan bahwa produksi plantarisin LR14 hanya 59,21 µg/l dan produksi plantarisin tertinggi oleh *L. plantarum* A-1 hanya mencapai 3,5 mg/l. Hal ini mengakibatkan sulitnya mendeteksi aktivitas antimikroba dari bakteriosin.

Simpulan dan Saran

Isolat BAL yang diperoleh dari susu sapi merupakan bakteri berbentuk batang, Gram positif, tidak menghasilkan endospora dan tidak memproduksi enzim katalase. Hasil analisis molekuler menunjukkan bahwa sekuens 16S rRNA dari isolat BAL memiliki kemiripan yang tinggi dengan *L. paracasei* strain L1 (100%) and *L. casei* strain WX121 (99,84%). Uji aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa CFS yang dihasilkan isolat BAL mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*. Efek penghambatan oleh CFS isolat BAL dipengaruhi oleh perbedaan nilai pH,

tetapi tidak dipengaruhi oleh suhu. pH yang lebih rendah menghasilkan penghambatan yang lebih baik.

Antimikroba dari isolat BAL dapat dievaluasi lebih lanjut melalui pengujian kualitatif menggunakan metode *broth dilution assay* atau *time kill test*. Selain itu, molekul antimikroba lain yang dihasilkan oleh isolat BAL perlu dianalisis lebih lanjut, misalnya dengan pengecekan keberadaan bakteriosin.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Danish Andrian dan Denny Rizkinata karena telah menyediakan isolat BAL untuk penelitian ini, serta kepada Program Studi Biologi UPH karena telah menyediakan Laboratorium Biologi Dasar (203) dan Laboratorium Biologi Lanjutan (407) sebagai tempat berlangsungnya penelitian.

Daftar Pustaka

- Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G. & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-10.
- Bratcher, D. (2018). Other gram-positive bacilli. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease* 4: 786-790.
- Cappuccino, J. G. & Welsh, C. (2019). *Microbiology: a laboratory manual*. Pearson. New York.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2018). *Staphylococcal (Staph) Food Poisoning*, Retrieved August 20, 2022, from <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>.
- Colombo, M., Castilho, N. P., Todorov, S. D. & Nero, L. A. (2018). Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology* 18: 219.
- Febriana, M. H., Purwijantiningih E. & Yuda, P. (2021). Identifikasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi singkong (Gatot) terhadap *Bacillus cereus* dan *Aspergillus flavus*.

- Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati* 6(1): 15-24.
- Gupta, R., Jeevaratnam, K. & Fatima, A. (2018). Lactic acid bacteria: probiotic characteristic, selection criteria, and its role in human health (a review). *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research* 5(10): 411-424.
- Hu, C. H., Ren, L. Q., Zhou, Y. & Ye, B. C. (2019). Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Science Nutrition* 7: 1997–2005.
- Huang, C. H., Li, S.W., Huang, L. & Watanabe, K. (2018). Identification and classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Frontiers in Microbiology* 9: 1974.
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods* 10(12): 3131.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C. & Mazhitov, B. (2018). Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 130: 012019.
- Ma, J., Yu, W., Han, X., Shao, H. & Liu, Y. (2020). Characterization and production optimization of a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* KLDS 1.0338 and its application in soybean milk biopreservation. *International Journal of Food Properties* 23(1): 677–692.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Bucklet, D. H., Sattley, W. M. & Stahl, D. A. (2022). *Brock Biology of Microorganisms 16th Edition*. Pearson. New York.
- Meng, F., Zhao, H., Zhang, C., Lu, F., Bie, X., & Lu, Z. (2016). Expression of a novel bacteriocin—the plantaricin Pln1—in *Escherichia coli* and its functional analysis. *Protein Expression and Purification* 119: 85-93.
- Mozzi, F. (2016). Lactic acid bacteria. In B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldra (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. Amsterdam.
- Mulaw, G., Tessema, T. S., Muleta, D. & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International Journal of Microbiology* 2019: 1–11.
- Noroozi, E., Mojangani, N., Motevaseli, E., Modarressi, M. H. & Tebianian, M. (2019). Physico-chemical and cytotoxic analysis of a novel large molecular weight bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TA0021. *Iranian Journal of Microbiology* 11(5): 397–405.
- Rafieian-Kopaei, M., Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H. & Leila, M. (2017). Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 7(3): 137.
- Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H. & Yu, H. (2018). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods. *Biomed Research International* 2018: 1-9.
- Rizkinata, D., Andrian, D., Tan, S. R., Jap, L. & Tan, T. J. (2018). Isolation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* as starter culture candidate originated from Indonesian cow's milk. *Microbiology and Biotechnology Letters* 46(3): 201-209.
- Robinson, R. C. (2019). Structures and metabolic properties of bovine milk oligosaccharides and their potential in the development of novel therapeutics. *Frontiers in Nutrition* 6: 50.
- World Health Organization. (2018). *Diarrheal disease*, Retrieved August 20, 2022, from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.