

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kambing Sebagai Bakteri Antagonis *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* Penyebab *Foodborne Disease*

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Goat Milk as Antagonistic Bacteria of Listeria monocytogenes and Escherichia coli Cause of Foodborne Disease

Annisa Yulina Susilowati¹, Siti Nur Jannah^{1*}, Hermin Pancasakti Kusumaningrum¹, Sulistiani²

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

²Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong Science Center (CSC), Bogor

*Korespondensi dengan penulis (nurjannah.suroso@gmail.com)

Artikel ini dikirim pada tanggal 12 Desember 2020 dan dinyatakan diterima tanggal 31 Desember 2022. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui www.ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/tekpangan. eISSN 2597-9892. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Abstrak

Listeria monocytogenes dan *Escherichia coli* merupakan kontaminan pangan berbahaya yang dapat mengakibatkan timbulnya *foodborne disease*. Mikrobia dengan aktivitas antibakteri seperti Bakteri Asam Laktat (BAL) yang berasal dari susu kambing dapat dijadikan solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut. Aktivitas antibakteri BAL disebabkan produksi asam laktat yang dapat menurunkan pH medium dan beberapa senyawa bioaktif seperti asam organik, H₂O₂, diasetil dan bakteriosin. Penelitian dilakukan untuk mengetahui jenis dan potensi BAL susu kambing sebagai antibakteri *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli*. Metode penelitian meliputi isolasi dan pengamatan morfologi BAL, uji ketahanan isolat BAL terhadap suhu dan pH, pewarnaan Gram, uji katalase (H₂O₂), Uji aktivitas antibakteri BAL, serta identifikasi secara molekuler isolat BAL yang menunjukkan potensi antibakteri. Isolat yang mampu menghambat *Listeria monocytogenes* adalah isolat 372 dengan diameter zona bening 5,2 mm serta isolat 469 menghambat *Escherichia coli* dengan zona bening berdiameter 5,8 mm. Identifikasi molekuler menunjukkan kedua isolat memiliki ukuran DNA genom 1500 bp tetapi hanya isolat 372 yang dilanjutkan hingga tahap sekuensing karena menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen lebih baik dibandingkan isolat 469 yang ditandai dengan zona bening terlihat lebih jelas. Berdasarkan analisis hasil sekuensing DNA melalui BLAST dapat diketahui bahwa isolat 372 merupakan *Pediococcus pentosaceus* strain 1931 dengan kemiripan homologi sebesar 99,72%.

Kata kunci : BAL, *foodborne disease*, antibakteri, identifikasi

Abstract

Listeria monocytogenes and *Escherichia coli* are dangerous food contaminants that can cause *foodborne disease*. Microbes with antibacterial activity such as Lactic Acid Bacteria (LAB) from goat's milk can be used as a solution to overcome these problems. LAB antibacterial activity is due to the production of lactic acid which can lower the pH of the medium and several bioactive compounds such as organic acids, H₂O₂, diacetyl, and bacteriocins. The study was conducted to determine the type and potential of LAB goat milk as antibacterial agents for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The research methods include isolation and observation of LAB morphology, resistance test of LAB isolates against temperature and pH, Gram staining, catalase test (H₂O₂), LAB antibacterial activity test, and molecular identification of LAB isolates that show antibacterial potential. Isolates capable of inhibiting *Listeria monocytogenes* were isolate 372 with clear zone diameter 5.2 mm and isolate 469 inhibited *Escherichia coli* with clear zone diameter 5.8 mm. Molecular identification showed that both isolates had a genomic DNA size of 1500 bp but only isolate 372 was continued to sequencing because it showed better inhibitory activity against pathogenic bacteria than isolate 469 which was marked with clearer visible zones. Based on the analysis of the results of DNA sequencing through BLAST, it can be seen that isolate 372 is *Pediococcus pentosaceus* strain 1931 with homology similarity 99.72%.

Keywords: LAB, *foodborne disease*, antibacterial, identification

Pendahuluan

Listeria monocytogenes dan *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen yang sering mengontaminasi pangan dan mengakibatkan timbulnya *foodborne disease*. Menurut Herman *et al.*, (2015) *foodborne disease* adalah penyakit akibat makanan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme atau racun. Penyakit ini kurang mewabah, tetapi berpotensi menyebabkan kematian. Berdasarkan data WHO, *foodborne disease* menyebabkan 420.000 kasus kematian di seluruh dunia pada tahun 2010 (Havelaar *et al.*, 2010) dan terus meningkat khususnya di negara-negara berkembang (Webb and Morancie, 2015). Astuti *et al.*, (2013) menyatakan, setiap tahun terdapat 2,2 juta orang di negara berkembang terutama anak-anak meninggal dunia akibat berbagai penyakit yang disebabkan oleh kurangnya air minum yang aman, sanitasi dan *hygiene* yang buruk. Menurut On dan Rahayu (2017), perkiraan jumlah kasus diare di Indonesia berkisar antara 10.189.312 hingga 22.476.423 per tahun. Prevalensi diare yang diakibatkan konsumsi makanan yang terkontaminasi *E.coli* di Jawa Tengah pada laporan Riskesdas (2013) tercatat sebanyak 3,3%. Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Tengah (2016) juga mencatat adanya kasus diare sebanyak 4.849 kasus di Surakarta.

Untuk mengatasi permasalahan *foodborne disease* akibat kontaminasi makanan oleh mikroba patogen dapat dilakukan dengan penggunaan agen biologis berupa mikrobia dengan aktivitas antibakteri seperti Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL secara

alami terdapat dalam bahan pangan seperti susu, daging, dan sayuran. Susu kambing merupakan susu yang mengandung nutrisi lengkap sehingga menjadi media pertumbuhan yang ideal untuk mikroorganisme (BAL).

Menurut Rasyid *et al.*, (2021) BAL dapat menghasilkan substansi antimikrobia diantaranya asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan diperkirakan juga bakteriosin yaitu protein atau polipeptida yang memiliki sifat antibakteri. Senyawa-senyawa tersebut memperlihatkan aktivitas antimikrobia terhadap banyak mikroorganisme patogen makanan seperti *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas*, dan lain-lain. Seleksi dan identifikasi molekuler BAL yang diisolasi dari susu kambing sebagai antagonis *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* sebagai penyebab *foodborne disease* belum banyak dilakukan. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan BAL yang memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli*.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Agustus 2020 di Laboratorium Mikrobiologi Industri, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor, Jawa Barat; Laboratorium Terpadu; dan Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Universitas Diponegoro, Semarang. Pengambilan sampel susu kambing dilakukan di Kelompok Ternak Mandiri Jaya Pakansari, Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

Materi

Bahan yang digunakan yaitu sampel susu kambing Saanen (SKA), Alpen (SKB) dan Jawarandu (SKC); isolat bakteri *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli*; CaCO₃ (Merck 1.02066.0250); MRS Broth (Merck 1.10661.0500); normal saline 0,85% (NaCl); BaCl₂; H₂SO₄; HCl; NaOH; MRS Agar (Merck); kloramfenikol 30 µg; Phospat Buffer Saline (PBS); media Nutrient Agar (Merck); media Nutrient Broth (Merck); pewarna Gram (Gram A, Gram B, Gram C, Gram D); H₂O₂ 3%; TAE buffer 1X; Chelex 20%; agarose 1%; DNA staining; ddH₂O; GoTag® Green master mix 2x; DNA template; parafilm; primer 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'); dan primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Alat yang digunakan yaitu *cooling box*, timbangan (Vibra), sendok timbang, *Laminar Air Flow* (Bio Clean Bench), mikrotube, corning, mikropipet, tip (10 µL, 100 µL, 1000 µL, 5 mL), pipet tetes, *aluminium foil*, plastik *wrap*, plastik tahan panas, inkubator (Isuzu Seisakusho Co.,Ltd), kertas lakmus (Merck 1.09535.0001), *anaerobic jar*, lampu spiritus, cawan petri (Pyrex®Iwaki), autoklaf (Hirayama Hiclave HVE-50), vorteks (Sibata), botol schott, *hotplate*, *microwave* (Brabantia), tabung ulir (Pyrex®Iwaki), gelas ukur (Pyrex®Iwaki), pH meter (LAqua Horiba), lemari pendingin (Sharp), rak tabung reaksi, ose bulat, *PCR tube*, *thermal cycler* PCR (Labnet International, Inc.), elektroforesis (Advance), *gel documentation system* (Uvitec Cambridge); nanodrop (Thermo Scientific); jangka sorong; *Eppendorf MiniSpin Centrifuge*.

Metode

Pengambilan Sampel

Sebanyak 250 ml susu dari jenis kambing berbeda (Saanen, Alpen, dan Jawarandu) diperah kemudian ditempatkan di botol sampel steril, diberi kode (SKA, SKB, dan SKC), serta tanggal sampling. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam *cooling box* berisi es batu dan dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Industri, Puslit Biologi, LIPI untuk disimpan di lemari es.

Isolasi BAL dari Sampel Susu Kambing

Isolasi BAL dilakukan menggunakan media MRSA + 0,5%CaCO₃. Pengenceran serial dilakukan mulai dari 10⁻¹ g/mL (1 mL sampel susu dicampurkan kedalam 9 mL 0,85% NaCl) hingga pengenceran 10⁻⁵ g/mL. Sebanyak 100 µL sampel dari masing-masing pengenceran ditumbuhkan dengan teknik *spread plate*. Kemudian diinkubasi secara anaerob dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam dan dilanjutkan dengan penghitungan jumlah koloni menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi morfologi meliputi pengamatan secara makroskopis meliputi bentuk koloni, ukuran koloni, warna koloni, elevasi, bentuk struktur dalam, tepi koloni, dan permukaan koloni serta secara mikroskopis meliputi bentuk sel dan susunan sel yang diamati dengan mikroskop.

Uji Ketahanan Isolat BAL terhadap Suhu Inkubasi dan pH

Uji ketahanan isolat BAL terhadap suhu inkubasi dilakukan dengan cara satu ose isolat BAL dimasukkan dalam media MRSB. Isolat diinkubasi pada suhu 10°C, 37 °C, dan 45°C selama 2-5 hari. Sedangkan untuk uji ketahanan isolat BAL terhadap pH, sebanyak satu tetes kultur BAL ditumbuhkan pada media MRSB dengan pH 4,0, 7,0 dan 9,0 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Uji Katalase

Aquades steril diteteskan diatas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek lalu ditetesi dengan H₂O₂ 3%, dидiamkan selama satu menit.

Uji Pewarnaan Gram

Satu ose isolat BAL ditetesi kristal violet (Gram A) sebanyak 2 tetes, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan aquades. Selanjutnya ditetesi lugol (Gram B) sebanyak 3 tetes, didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan *aquadest*. Preparat kemudian dilunturkan dengan pemberian larutan alkohol (Gram C) sebanyak 3 tetes selama 20 detik, dicuci, diberi pewarna safranin (Gram D) selama 15 detik, dan dicuci lagi dengan *aquadest*. Selanjutnya morfologi sel diamati dengan mikroskop. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu dan bakteri negatif ditandai dengan warna merah (Nurbaiti *et al.*, 2016).

Uji Aktivitas Antimikrobia BAL

Uji aktivitas antimikrobia BAL terhadap *Listeria monocytogenes* dan *E.coli* dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan sumuran. Sebanyak 100 μ L kultur bakteri uji yang telah disetarakan dengan larutan standar 0,5 Mc Farland ditanam diatas medium *Nutrient Agar* (NA) dengan metode *spread plate*. Kemudian media dibiarkan mengering dan selanjutnya dibuat sumuran berdiameter 1 cm. Isolat BAL, kontrol positif (30 μ g kloramfenikol), dan kontrol negatif (*aquadest* steril) diinjeksikan masing-masing sebanyak 20 μ L pada sumuran dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.

Identifikasi Molekuler BAL Potensial dari Susu Kambing

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode *Chelating Ion Exchange* (Chelex) (Walsh *et al.*, 2013). Sel bakteri ditambah 100 μ L *aquabidest* dan 1 mL PBS 1X, didiamkan *overnight* pada suhu 4°C kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, *supernatant* dibuang. Selanjutnya ditambahkan 1 mL PBS 1X, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, *supernatant* dibuang. Kemudian ditambahkan 100 μ L *aquabidest* dan 50 μ L chelex 20%, divorteks selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. *Supernatant* dipindahkan ke *tube* baru dan disimpan dalam *freezer*. Kuantitas dan kemurnian DNA dilihat dengan alat nanodrop.

Amplifikasi PCR gen 16S rRNA dilakukan dengan volume per reaksi 50 μ L menggunakan primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Komposisi reaksi PCR terdiri dari 25 μ L GoTag® Green *master mix* 2x, 2 μ L primer 27F 10 μ M, 2 μ L primer 1492R 10 μ M, 2 μ L (10-100 ng) DNA *template*, serta ddH₂O hingga volume 50 μ L. Menurut Sulistiani dan Khusniati (2016) PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan predenaturasi pada temperatur 94°C selama 90 detik, denaturasi pada temperatur 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada temperatur 50°C selama 30 detik dan ekstensi pada temperatur 72°C selama 90 detik. Fase pemanjangan pada temperatur 72°C selama 5 menit dan pendinginan pada temperatur 4°C selama 20 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis dalam gel agarosa 1% selama 30 menit dengan tegangan listrik 100V. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan DNA *staining* (*Gel Red*). 0,01% *Gel Red* (10 μ L *Gel Red* dalam 100 ml TAE 1X) selama 30 menit kemudian diamati dan didokumentasikan menggunakan *Gel Documentation System*.

Sekuensing DNA dilakukan dengan mengirimkan produk PCR ke PT Genetika Science Indonesia. Hasil sekuen DNA diedit dengan program BioEdit dan dikonversi dalam bentuk FASTA. Pencarian sekuen homolog dari GenBank dilakukan menggunakan program aplikasi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Analisis filogenetik dilakukan dengan menyajjarkan sekuen DNA yang dianalisis dengan sekuen DNA homolog menggunakan *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6 (Tamura *et al.*, 2013). Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metoda *Neighbor Joining* (NJ), program MEGA versi 6 dengan 1000 kali ulangan (*bootstrap*).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi BAL dari Sampel Susu Kambing

Sebelum dilakukan proses isolasi BAL, terlebih dahulu dilakukan pengukuran pH sampel menggunakan pH indicator untuk memastikan sampel dalam kondisi baik. Adapun hasil pengukuran pH menunjukkan bahwa ketiga sampel susu kambing (SKA, SKB, dan SKC) memiliki pH normal yaitu 7,0. Menurut Wu *et al.*, (2020), nilai pH susu kambing segar berada pada kisaran 6,6-6,8.

Isolasi BAL dilakukan menggunakan media selektif MRSA untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan mendapatkan koloni BAL yang diinginkan serta menghambat pertumbuhan bakteri lain (Ibrahim *et al.*, 2015). Inkubasi dilakukan secara anaerob menggunakan *anerobic jar*. Menurut Ardilla *et al.*, (2022), bakteri asam laktat merupakan bakteri yang kebanyakan bersifat anaerob fakultatif yang tumbuh lebih baik pada kondisi tidak ada oksigen (anaerob) dibandingkan dengan kondisi berlimpah oksigen (aerob).

Koloni bakteri yang diperoleh berwarna putih hingga putih kekuningan, berukuran 1-2 mm, dan terdapat zona bening disekitar koloni. Zona bening yang terbentuk menjadi karakterisasi awal dalam memilih BAL karena menunjukkan bahwa metabolit utama yang dihasilkan adalah asam laktat yang mampu melarutkan CaCO₃. Menurut Melliawati *et al.*, (2015) luas zona bening yang terbentuk menunjukkan kemampuan bakteri dalam mengekskresikan asam ke medium yang mengandung CaCO₃. Lawalata dan Satiman (2015) menyatakan bahwa zona bening yang terbentuk merupakan reaksi antara asam organik yang dihasilkan bakteri dan CaCO₃ yang terdapat dalam media. Senyawa CaCO₃ merupakan senyawa yang umum digunakan untuk menyeleksi bakteri BAL karena akan bereaksi dengan asam laktat menjadi kalsium laktat (C₆H₁₀CaO₆) sehingga warna media terlihat bening.



Gambar 1. Koloni BAL susu kambing yang diinkubasi pada media MRSA + 0,5% CaCO₃ selama 48 jam secara anaerob

Analisis TPC hanya dilakukan pada sampel dengan faktor pengenceran 10⁻² karena memiliki jumlah koloni yang lebih dari 30 dan kurang dari 300. Adapun tabel hasil analisis TPC dari sampel susu kambing adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Analisis TPC BAL Susu Kambing pada Media MRSA+0,5% CaCO₃

Sampel Susu Kambing	Hasil TPC (CFU/mL)
SKA	8,1x10 ⁴
SKB	1,75x10 ⁵
SKC	2,71x10 ⁵

Keterangan: SKA= sampel susu kambing A,SKB = sampel susu kambing B, SKC = sampel susu kambing C

Isolat diduga BAL yang diperoleh dari sampel susu kambing SKA (kambing Saanen) yaitu 352, 353, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 364, 372, 373, dari sampel SKB (kambing Alpen) yaitu isolat 469, dan sampel SKC (kambing Jawarandu) yaitu isolat 524, 525, 527, 528, 543, 544, 545, 546, 547, 549, 550, 556. Seluruh isolat diinokulasikan ke dalam media MRSB untuk dilakukan pengujian lebih lanjut.

Karakterisasi Morfologi

Tabel 2. Hasil Pengamatan Koloni BAL Secara Makroskopis

Isolat	Morfologi						
	Bentuk Koloni	Warna	Tepian	Elevasi	Diameter (cm)	Bentuk Struktur Dalam	Permukaan
352	Circular	Putih	Rata	Convex	0,1	Opaque	Mengkilap (licin)
372	Circular	Putih kekuningan	Rata	Convex	0,2	Opaque	Mengkilap (licin)
373	Circular	Putih	Rata	Convex	0,1	Opaque	Tidak terlalu mengkilap
469	Circular	Putih	Rata	Convex	0,1	Opaque	Tidak terlalu mengkilap

Karakterisasi hanya dilakukan pada isolat 352, 372, 373, dan 469 karena dari total 24 isolat, hanya 4 isolat tersebut yang dapat diremajakan pada media MRSA. Hal ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan kondisi ketika isolasi dan peremajaan. Isolasi BAL dilakukan dalam kondisi anaerob, sedangkan peremajaan dilakukan dalam kondisi aerob. Keberadaan oksigen menyebabkan bakteri mati/ terhambat pertumbuhannya. Karakterisasi morfologi secara makroskopis dilakukan dengan cara melihat langsung morfologi koloni yang tumbuh pada medium (Ibrahim *et al.*, 2015). Berdasarkan pengamatan, keempat isolat memiliki koloni berbentuk *circular* (bulat), berwarna putih, *opaque* (tidak dapat ditembus cahaya), serta memiliki tepian rata (*enpitire*). Koloni dari isolat 352, 373, dan 469 memiliki diameter berukuran 0,1 cm, sedangkan isolat 372 berukuran sekitar 0,2 cm. Isolat 352 dan 372 memiliki permukaan mengkilap (licin), sedangkan isolat lainnya yaitu 373 dan 469 tidak terlalu mengkilap. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan keempat isolat memiliki bentuk kokus.

Uji Ketahanan Isolat BAL terhadap Suhu Inkubasi dan pH

Isolat yang diinkubasi pada suhu 10°C dan 45°C seluruhnya tidak dapat tumbuh, sebaliknya isolat BAL yang ditumbuhkan pada suhu 37°C dapat tumbuh dengan baik. Hal tersebut dikarenakan suhu 37°C merupakan suhu optimum pertumbuhan BAL. Parahardini *et al.*, (2020) menyatakan bahwa bakteri asam laktat memiliki rentang suhu optimal 37°C - 42°C. Menurut Suroso (2014), bakteri yang memiliki suhu optimum pertumbuhan 25°C dan suhu maksimumnya 37°C - 40°C termasuk golongan bakteri mesofilik. Contoh bakteri mesofilik adalah genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc*.

Hasil uji ketahanan terhadap pH menunjukkan bahwa seluruh isolat BAL dapat tumbuh dengan baik pada pH 7,0, sebaliknya pada pH 9,0 keempat isolat tidak dapat tumbuh sama sekali. Isolat 469 merupakan satu-satunya isolat yang menunjukkan aktivitas pertumbuhan pada pH 4,0 meskipun endapan yang dihasilkan sangat sedikit. Faktor yang

mempengaruhi bakteri tidak tumbuh pada pH yang terlalu asam/ terlalu basa adalah perbedaan habitat asal *starter*. Penelitian yang dilakukan oleh Yang *et al.*, (2018) menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL dapat terjadi pada kisaran pH 6,2-8.5. Beberapa strain BAL tidak dapat tumbuh pada pH 4,5 terlepas dari media atau suhu inkubasi yang dipilih. Wiyana (2011) menyatakan bahwa kebanyakan mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6,0-8,0 dan tidak dapat bertahan hidup pada pH dibawah 2 dan diatas 10.

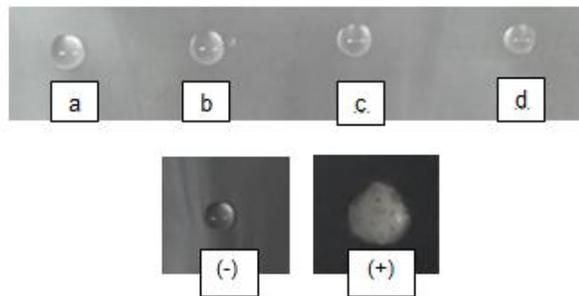
Tabel 3. Hasil Uji Ketahanan Isolat BAL terhadap Suhu Inkubasi dan pH

Isolat	Suhu Inkubasi			pH		
	10°C	37°C	45°C	4,0	7,0	9,0
352	TT	T	TT	TT	T	TT
372	TT	T	TT	TT	T	TT
373	TT	T	TT	TT	T	TT
469	TT	T	TT	TS	T	TT

Keterangan: T= Tumbuh, TS = Tumbuh Sedikit, TT = Tidak Tumbuh

Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat BAL dalam menghasilkan enzim katalase dan toleransi isolat terhadap oksigen. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan larutan hidrogen peroksida 3% ke isolat BAL. Berdasarkan uji katalase yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa keempat isolat bersifat katalase negatif. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gelembung gas berisi oksigen ketika koloni BAL ditetesi dengan H₂O₂. Irma *et al.*, (2022) menyatakan bahwa gelembung udara yang terbentuk menjadi indikator bahwa bakteri mempunyai enzim katalase yang mampu memecah hidrogen peroksida. Hasil uji katalase terhadap isolat 543 digunakan sebagai pembanding karena menunjukkan adanya gelembung oksigen setelah ditetesi H₂O₂. BAL pada umumnya tidak memiliki enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Menurut Suhaeni dan Akhmad (2016), BAL merupakan bakteri katalase negatif karena tidak menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida.

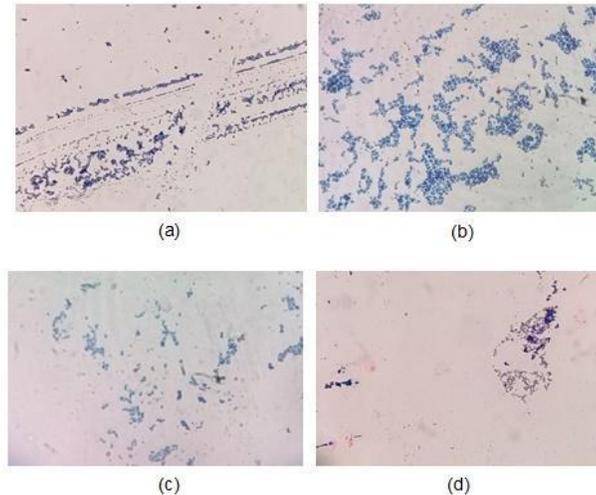


Gambar 2. Hasil uji katalase isolat BAL a) isolat 352, b) isolat 372, c) isolat 373, dan d) isolat 469, (-) katalase negatif, (+) katalase positif

Anastiwan (2014) menyatakan saat melakukan respirasi, bakteri menghasilkan berbagai macam komponen salah satunya H₂O₂. Bakteri yang memiliki kemampuan memecah H₂O₂ dengan enzim katalase membentuk suatu sistem pertahanan dari toksik H₂O₂ yang dihasilkannya sendiri. Bakteri katalase positif akan memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ dimana parameter yang menunjukkan adanya aktivitas katalase tersebut adalah *buble* (buih) berupa gelembung-gelembung oksigen. Bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung tersebut. Hal ini berarti H₂O₂ yang diberikan tidak dipecah oleh bakteri katalase negatif sehingga tidak menghasilkan oksigen.

Uji Pewarnaan Gram

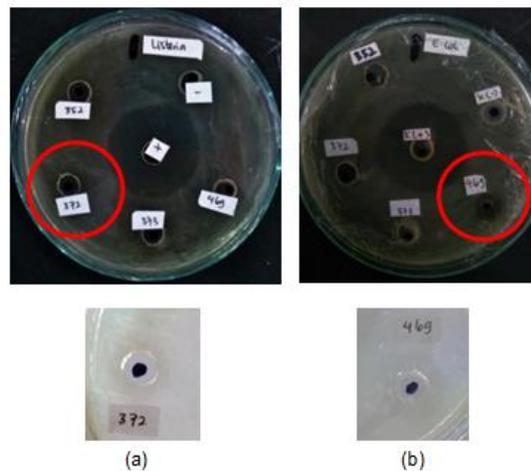
Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa keempat isolat (352, 372, 373, dan 469) merupakan bakteri Gram positif. Hal ini ditunjukkan dengan sel yang berwarna ungu setelah diwarnai. Menurut Abubakr dan Adiwish (2017) bakteri asam laktat termasuk dalam kategori bakteri gram positif. Melalui pewarnaan Gram, dapat diketahui sifat dinding sel bakteri terhadap pewarna kristal violet dan safranin. Bakteri gram positif memiliki dinding sel seperti jaring tebal yang terdiri dari peptidoglikan (50-90% dinding sel), yang berwarna ungu. Lapisan peptidoglikan yang tebal pada organisme Gram-positif memungkinkan organisme ini mempertahankan kompleks kristal violet dan menodai sel dengan warna ungu. Bakteri Gram-negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis (10% dari dinding sel) dan kehilangan kompleks kristal violet selama pembilasan dengan alkohol, tetapi tetap mempertahankan safranin, sehingga tampak kemerahan atau merah muda (Thairu *et al.*, 2016).



Gambar 8. Hasil uji pewarnaan Gram a) isolat 352, b) isolat 372, c) isolat 373, dan d) isolat 469

Uji Aktivitas Antimikrobia BAL

Pengujian antibakteri bertujuan untuk mengukur berapa besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi bakteri patogen (Nendissa, 2012). Pengujian daya hambat isolat BAL dari susu kambing dilakukan terhadap dua jenis bakteri uji yang berbeda, yaitu *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi agar dengan sumuran (*Agar Well Diffusion*).



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri BAL terhadap a) bakteri *Listeria monocytogenes*, b) bakteri *Escherichia coli*

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, didapatkan 2 isolat yang menghambat bakteri patogen yang diujikan, tetapi masing-masing isolat hanya mampu menghambat satu jenis bakteri patogen saja. Isolat 372 mampu menghambat *Listeria monocytogenes*, sedangkan yang menghambat *Escherichia coli* adalah isolat 469. Penghambatan pertumbuhan bakteri uji ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terbentuk.

Hasil pengukuran menggunakan jangka sorong menunjukkan diameter zona hambat sampel 372 adalah 5,2 mm, sedangkan zona hambat isolat 469 berdiameter 5,8 mm. Diameter zona hambat kontrol positif pada *Listeria monocytogenes* yaitu 17,3 mm, sedangkan pada *Escherichia coli* sebesar 19,5 mm. Hal ini menunjukkan bahwa daya hambat kloramfenikol tergolong kuat. Tarman *et al.* (2013) menyatakan bahwa kloramfenikol sebagai kontrol positif menunjukkan aktivitas antibakteri yang sangat kuat.

Efek penghambatan pertumbuhan bakteri-bakteri patogen diakibatkan oleh agen antibakteri seperti asam laktat dan bakteriosin yang dimiliki oleh BAL. Hal ini dikarenakan asam laktat mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen akan sulit bertahan hidup, sedangkan bakteriosin menghambat produksi energi dan biosintesis protein pada bakteri patogen. Menurut Hamidah *et al.*, (2019) BAL memproduksi berbagai macam senyawa antibakteri seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), karbon dioksida (CO_2), diasetil (2,3-butanedione) dan bakteriosin. Semua senyawa tersebut bersifat antagonis terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen dan pembusuk makanan. Fauziah *et al.*, (2014) menyatakan bahwa bakteriosin bekerja dengan menghambat produksi energi dan biosintesis protein pada bakteri pathogen. Tabel hasil pengujian daya hambat isolat BAL terhadap bakteri uji *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil Uji Antibakteri Isolat BAL terhadap *L. monocytogenes* dan *E. coli*

Bakteri Uji	Diameter Kloramfenikol (mm)	Isolat	Zona Hambat	Diameter Zona Hambat Isolat BAL (mm)
<i>Listeria monocytogenes</i>	17,3	352	-	-
		372	+	5,2
		373	-	-
		469	-	-
<i>Escherichia coli</i>	19,5	352	-	-
		372	-	-
		373	-	-
		469	+	5,8

Keterangan: (+): Terdapat Zona Hambat, (-): Tidak Terdapat Zona Hambat

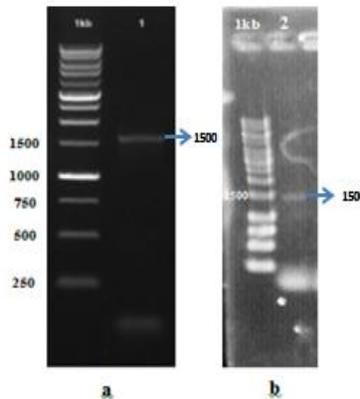
Identifikasi Molekuler BAL Potensial dari Susu Kambing

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA genom isolat BAL dari susu kambing dapat diisolasi dengan menggunakan metode Chelex. Isolat 352 memiliki konsentrasi DNA sebesar 20,9 ng/µl, isolat 372 sebesar 35,5 ng/µl, isolat 373 sebesar 19,5 ng/µl, serta isolat 469 sebesar 13,1 ng/µl. Konsentrasi DNA tersebut mempunyai kualitas yang baik sehingga dapat dilanjutkan ke proses PCR. Kemurnian DNA dari keempat sampel berkisar antara 1,21-1,68. Emilia dan Anhar, (2021) menyatakan bahwa nilai kemurnian DNA berkisar 1.8-2.0. Hasil penelitian yang dilakukan Kartini (2012) menunjukkan bahwa DNA dengan kemurnian 1,12-1,64 juga mampu teramplifikasi dan menghasilkan pola pita amplifikasi yang jelas. Adapun hasil pengukuran kuantitas dan kemurnian DNA adalah sebagai berikut:

Tabel 5. Nilai Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Ekstraksi DNA Sampel

Isolat	Konsentrasi DNA (ng/µL)	Kemurnian DNA (260/280)
352	20,9	1,6
372	35,5	1,21
373	19,5	1,68
469	13,1	1,42

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebanyak 35 siklus menggunakan primer 27F dan 1492R.



Gambar 4. Hasil elektroforesis sampel DNA a) sampel 372, b) sampel 469

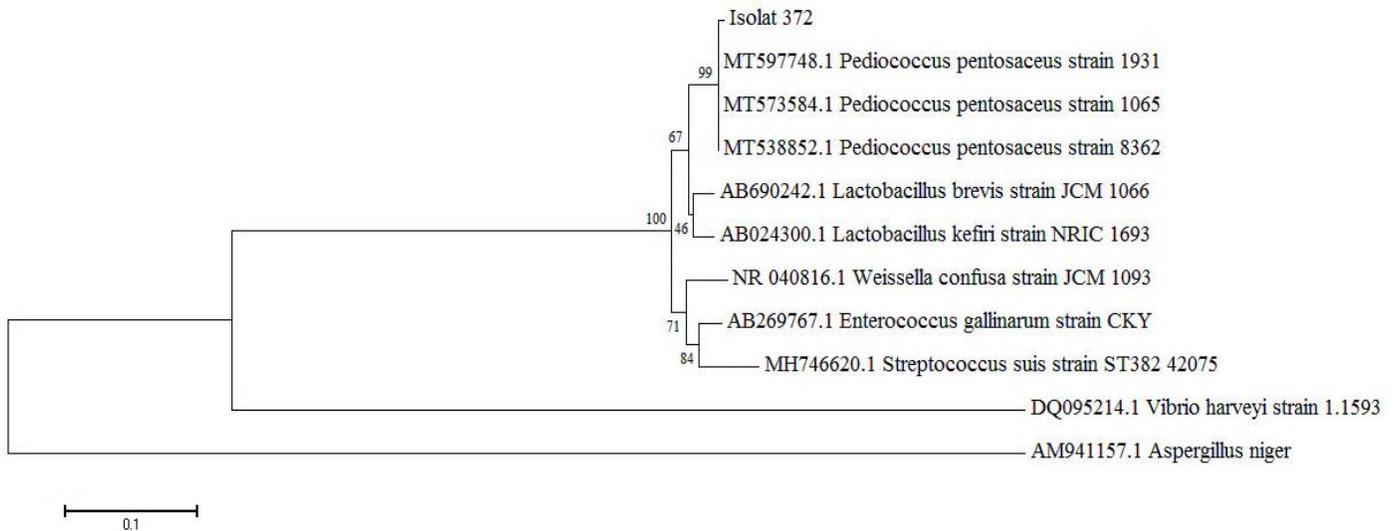
Hasil uji kualitatif dengan elektroforesis menunjukkan dari 4 sampel yang di PCR, hanya 2 sampel yang menghasilkan pita DNA yaitu sampel 372 dan 469. Berdasarkan visualisasi hasil PCR sampel 372 dan 469, dapat diketahui bahwa ukuran DNA genom yang dihasilkan adalah 1500 bp. Rinanda (2011) menyatakan bahwa gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*. Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Sekuensing hanya dilakukan pada isolat 372 karena isolat tersebut memperlihatkan penghambatan terhadap bakteri patogen yang lebih baik dibandingkan isolat 469. Hal ini ditunjukkan dengan zona bening isolat 372 yang terlihat lebih jelas.

Berdasarkan analisis hasil sekuensing DNA melalui BLAST dapat diketahui bahwa isolat 372 memiliki kemiripan/similaritas dengan *Pediococcus pentosaceus* strain 1931 (99.72%), *Pediococcus pentosaceus* strain 1065 (99.72%), *Pediococcus pentosaceus* strain 4348 (99%), *Pediococcus pentosaceus* strain 8362 (99.72%), dan *Pediococcus pentosaceus* strain 7542 (99.72%). Masing-masing memiliki *query cover* 99%. *Query cover* adalah presentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat di BLAST. Isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat mewakili pada tingkat spesies yang sama. Persamaan sekuen 16S rDNA antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies. Sedangkan jika dibawah 93% kemungkinan spesies baru yang urutan basa nitrogennya

belum masuk dalam data base gen bank. Menurut Haas *et al.*, (2011) persamaan sekuen 16S rDNA yang lebih rendah ($\leq 96\%$) kemungkinan besar disebabkan oleh elektroferogram yang tumpang tindih dan kemungkinan membentuk "urutan *chimeric*" yang berbeda. Sebaliknya, Chen *et al.*, (2015) menyatakan bahwa identitas dengan kemiripan $\geq 98\%$ pada entri database dapat diperoleh karena elektroferogram yang tumpang tindih telah dibuang.

Pediococcus pentosaceus merupakan spesies bakteri yang mempunyai kemampuan menghasilkan agen antimikroba (*bacteriocins*) serta digunakan dalam pengawetan makanan. *Pediococcus* berbentuk *coccus*, gram positif, tidak membentuk spora, tidak bergerak (non-motil) dan dikategorikan sebagai BAL karena produk akhir metabolisme adalah asam laktat (Nurlaela *et al.*, 2016). Isolat 372 yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* bekerja lebih baik dalam menghambat *Listeria monocytogenes* daripada *Escherichia coli* karena mampu menghasilkan pediosin yang berfungsi sebagai antilisterial. Menurut Marwati, dkk (2012) *Pediococcus* menghasilkan bakteriosin kelas IIa (pediosin-*pediocin like bacteriocin*) yang dikenal sebagai antilisterial. Pediosin berpengaruh terhadap aktivitas pertumbuhan bakteri patogen karena menghasilkan ion positif tiga valensi Gadolinium (Gd^{3+}) yang mampu menghambat aktivitas nisin Z terhadap bakteri *Listeria monocytogenes*. Hasil *scanning electron microscope* (SEM) sel *Listeria monocytogenes* menunjukkan bahwa perlakuan dengan pediosin menyebabkan dinding sel dan membran sel rusak sehingga mengakibatkan terjadinya lisis sel.

Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat 372 diidentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* strain 1931, hal ini ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* 99%. Lemoine *et al.*, (2018) menyatakan bahwa *bootstrap* adalah metode statistik yang banyak digunakan untuk mempelajari *robustness*, bias, dan variabilitas perkiraan numerik. Nilai *bootstrap* 70% adalah ambang batas untuk mengindikasikan bahwa spesies-spesies yang berada satu klade merupakan spesies yang sama.



Gambar 5. Pohon filogenetik isolat 372 dibandingkan dengan sekuen DNA pengkode 16S rRNA BAL dari genus *Pediococcus*. Angka menunjukkan nilai *bootstrap*.

Kesimpulan

Sebanyak 24 isolat BAL dapat diisolasi dari sampel susu kambing Saanen, Alpen, dan Jawarandu, tetapi hanya 4 isolat yang dapat diremajakan pada media MRSA + 0,5% $CaCO_3$ yaitu 352,372,373, dan 469. Isolat BAL tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dan pH 7. Isolat 469 dapat tumbuh pada pH 4 tetapi jumlah koloni sangat sedikit. Keempat isolat menghasilkan asam laktat, termasuk dalam kelompok bakteri gram positif, berbentuk *coccus* (bulat) dan bersifat katalase negatif. Isolat BAL yang mampu menghambat *Listeria monocytogenes* adalah isolat 372 (yang diisolasi dari susu kambing Saanen) dengan diameter zona bening 0,52 cm serta isolat 469 (yang diisolasi dari susu kambing Alpen) menghambat *Escherichia coli* dengan zona bening berdiameter 5,8 mm. Isolat BAL yang berpotensi menghambat *Listeria monocytogenes* teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* strain 1931 dengan kemiripan homologi sebesar 99,72%.

Daftar Pustaka

- Abubakr, M.A.S., dan W.M. Al-Adiwish. 2017. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Different Fruits with Proteolytic Activity. *International Journal of Microbiology and Biotechnology* 2 (2): 58-64.
- Ardilla, Y. A., K. W. Anggreini, dan T. P.D. Rahmani. 2022. Peran Bakteri Asam Laktat Indigen Genus *Lactobacillus* pada Fermentasi Buah Durian (*Durio zibethinus*) Sebagai Bahan Pembuatan Tempoyak. *Berkala Ilmiah Biologi* 13(2): 42-52.
- Astuti, Y, Sumardiyono, H.L.B. Wibowo, dan H. Hermawan. 2013. Komunikasi Informasi Edukasi PHBS (Perilaku Hidup Bersih dan Sehat) Semester V. Modul Field Lab Edisi Revisi II. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Badan Pusat Statistik. 2016. Provinsi Jawa Tengah dalam Angka. BPS. Jawa Tengah.

- Chen J., X. Miao, M. Xu, J. He, Xie, X. Wu, G. Chen, L. Yu, and W. Zhang. 2015. Intragenomic Heterogeneity in 16S rRNA Genes in Strictly Anaerobic Clinical Isolates from Periodontal Abscesses. *PLOS ONE* 10:1–19.
- Emilia, E., & Anhar, A. (2021). Optimalisasi Metode Ekstraksi DNA Daun, Kulit Kayu dan Kayu Pinus Merkusii. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian* 6(4): 766-778.
- Fauziah, P.N., J. Nurhajati, dan Chrysanti. 2014. Daya Antibakteri Filtrat Asam Laktat dan Bakteriosin *Lactobacillus bulgaricus* KS1 dalam Menghambat Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* Strain ATCC 700603, CT1538 dan S941. *Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran. Majalah Kedokteran Bandung* 47(1):35-41.
- Haas, B.J., D. Gevers, A.M. Earl, M. Feldgarden, D.V. Ward, G. Giannoukos, D. Ciulla, D. Tabbaa, S.K. Highlander, E. Sodergren, B. Methé, T.Z. DeSantis, Human Microbiome Consortium, J.F. Petrosino, R. Knight, and B.W. Birren. 2011. Chimeric 16S rRNA Sequence Formation and Detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR Amplicons. *Genome Research* 21: 494–504.
- Hamidah, M. N., L. Rianingsih, dan R. Romadhon. 2019. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan* 1(2): 11-21.
- Havelaar, A.H., M.D. Kirk, P.R. Torgerson, H.J. Gibb, T. Hald, R.J. Lake. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden Of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med* 12(12): 1-23.
- Herman, M.R. Napirah, dan Sherlina. 2015. Faktor-Faktor Perilaku Hidup Bersih dan Sehat yang Berhubungan dengan Kejadian *Foodborne Disease* pada Anak di Sekolah Dasar Negeri (SDN) Inpres 3 Tondo Kota Palu. *Jurnal Kesehatan Tadulako* 1(2): 1- 78.
- Ibrahim, A., A. Fridayanti, dan F. Delvia. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica* L). *Jurnal Ilmiah Manuntung* 1(2): 159-163.
- Irma, A., J. B. Lukman, dan A. Nurfadillah. 2022. Karakterisasi Mikrobiota Mulut Penghasil Senyawa Antimikroba: Laboratory Research. *Journal of Vocational Health Science* 1(1): 34-39.
- Lemoine, F., J.B.D. Entfellner, E. Wikinson, D. Correia, M.D. Felipe, T. De Oliveira, and O. Gascuel. 2018. Renewing Felsenstein's Phylogenetic Bootstrap in the Era of Big Data. *Journal Nature* 556: 462-456.
- Melliawati Ruth. 2015. Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Penghasil Enzim Protease. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(2): 184-188.
- Nendissa, D.M. 2012. Analisa Kemampuan Alga Hijau Silpau (*Dictyosphaeria versluysii*) Sebagai Antibakteri. *Jurnal Ekosains* 1(1): 47-51.
- Nurbaiti, A., Rosyidi dan M. Ali. 2016. Skrining Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Usus Ayam Broiler sebagai Kandidat Probiotik untuk Unggas. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia* 2(1):144-149.
- Nurlaela, S., T. C. Sunarti, dan A. Meryandini. 2016. Formula Media Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat *Pediococcus pentosaceus* Menggunakan Substrat Whey Tahu. *Jurnal Sumberdaya Hayati* 2(2): 31-38.
- On, S.L.W., dan W.P. Rahayu. 2017. Estimates for The Burden and Costs of Foodborne Diarrhoeal Illness in Indonesia. *Asia Pacific Journal of Food Safety and Security* 3 (1): 3-16.
- Prahardhini, D., R. Rosidi, and I. H. Sulistyawan. 2020. Effects of Addition of Probiotics on Egg White Index and Egg Yolk Index of Spent Laying Hens. *Journal of Animal Science and Technology* 2(2): 139-146.
- Rasyid, B., K. M. Sandi, I. G. Sudarmanto, dan I. W. Karta. 2021. Isolasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari blondo virgin coconut oil terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedika*. 13(1): 56-67.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syah Kuala* 11(3): 172-177.
- Suhaeni dan A. Syakur. 2016. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dangke Asal Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan. *BIOGENESIS* 4(2): 79-83.
- Sulistiani dan T. Khususuati. 2016. Potensi Antibakteri Tiga Spesies Bakteri Asam Laktat Asli Enggano Terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk Makanan. *Jurnal Berita Biologi* 15(3): 285-293.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, K. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology & Evolution* 30: 2725–2729.
- Tarman, K., S. Purwaningsih, dan A.A.P.P. Negara. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Bakau Hitam (*Rhizophora mucronata*) Terhadap Bakteri Penyebab Diare. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 16(3): 249-258.
- Thairu, Y., I.A. Nasir, Y. Usman. 2016. Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine* 1(4): 168-174.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger, R. Higuchi. 2013. Chelex 100 as Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* 54: 506-513.
- Webb, M., and A. Morancie. 2015. Food Safety Knowledge of Food Service Works at A University Campus by Educational Level, Experience, and Food Safety Training. *Journal of Food Control* 50: 259-264.
- Wiyana, A. 2011. Karakteristik Ketahanan Bakteri Asam Laktat *Indigenous* Kefir Sebagai Kandidat Bakteri Probiotik Pada Kondisi Saluran Pencernaan. In *Vitro*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wu, C.S., J.H. Guo, M.J. Lin. 2020. Stability Evaluation of pH-Adjusted Goat Milk for Developing Ricotta Cheese with a Mixture of Cow Cheese Whey and Goat Milk *Journal Foods*. 9: 1-13.
- Yang, E., L. Fan, J. Yang, Y. Jiang, C. Doucette, S. Fillmore, and B. Walker, 2018. Influence of Culture Media, pH and Temperature on Growth and Bacteriocin Production of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria. *AMB express* 8(10): 1-14.