

MONOGRAF
BAL (*Enterococcus faecalis*)
SEBAGAI PROBIOTIK

Hasria Alang



GETPRESS INDONESIA

MONOGRAF
BAL (*Enterococcus faecalis*) SEBAGAI PROBIOTIK

Penulis: Hasria Alang

ISBN:

Editor : Dr. Oktavinis, M.Biomed.

Tri Putri Wahyuni, S.Pd.

Penyunting: Dr. Neila Sulung, N.S., S.Pd. , M.Kes.

Desain Sampul dan Tata Letak : Atyka Trianisa, S.Pd.

Penerbit: GETPRESS INDONESIA

Anggota IKAPI No. 033/SBA/2022

Redaksi:

Jl. Palarik RT 01 RW 06, Kelurahan Air Pacah
Kecamatan Koto Tengah, Padang, Sumatera Barat

website: www.getpress.co.id

email: adm.getpress@gmail.com

Cetakan pertama, Januari 2024

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk
dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT Tuhan semesta alam, atas rahmat dan taufik-Nya sehingga monograf yang berjudul “BAL (*Enterococcus faecalis*) SEBAGAI PROBIOTIK” ini dapat diselesaikan.

Ketertarikan menulis monograf ini karena tingginya laporan tentang kasus resistensi akibat pemakaian antibiotik untuk menangani penyakit akibat infeksi mikroba. Selain itu kasus *food born disease* akibat mengkonsumsi makanan yang telah tercemar oleh mikroba patogen, juga menjadi alasan penulisan buku ini. Dibeberapa negara, Bakteri asam laktat (BAL) telah banyak dimanfaatkan terutama dalam bidang kesehatan. Keuntungan pemakaian terutama karena tidak menimbulkan resistensi dan aman digunakan serta dapat memberikan berbagai dampak positif pada orang yang mengonsumsinya. Berbeda dengan pemakaian antibiotik.

Buku monograf ini ditulis dengan merujuk pada beberapa sumber pustaka ilmiah, sedangkan proses isolasi, uji potensi dan identifikasi berasal dari hasil penelitian dari tahun 2016 hingga 2019, yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Dr. Suharjono, M.Si., Ibu Tri Ardiyati, PhD., dari Laboratorium Mikrobiologi F.MIPA dan Bapak Dr. Joni Kusnadi, M.Si. dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya yang telah banyak memberikan bimbingan bagi penulis dalam melakukan penelitian BAL ini. Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada Bapak Yoga Dwijatmiko, Ph.D., ibu

Nanik Dwirahayu dan teman-teman dari Laboratorium Mikrobiologi yang juga telah banyak membantu penulis dalam melaksanakan penelitian ini. Juga kepada suami, Dr. Syamsuri, M.Si. yang selalu mensupport hingga penulis akhirnya termotivasi dan mulai percaya diri menyelesaikan naskah ini. Juga kepada Bapak Dr. Bambang F.Suryadi, M.Si. yang telah mengajarkan penulis terkait metode penulisan monograf. Semoga segala ilmu dan bantuan yang diajarkan ke penulis, dapat menjadi amal Jariyah Bapak/Ibu, Aamiin YRA.

Penulis menyadari, monograf ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran senantiasa penulis harapkan. Penulis berharap, semoga monograf ini dapat menjadi salah satu sumber pengetahuan terhadap mahasiswa atau dosen ataupun peneliti yang tertarik untuk meneliti BAL khususnya *E.faecalis*.

Pontianak, Desember 2023
Penulis

Hasria Alang

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
BAB I PROBIOTIK	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan dan Tujuan	12
BAB II ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAL SEBAGAI PROBIOTIK	13
2.1 Isolasi BAL dari susu.....	13
2.2 Skrining Kandidat Probiotik	21
BAB III <i>Enterococcus faecalis</i>	29
3.1 Sejarah Penemuan <i>E. faecalis</i>	29
3.2 Karakteristik <i>Enterococcus faecalis</i>	29
BAB IV PRODUKSI, KARAKTERISASI METABOLIT	41
DAN DETEKSI GEN PENYANDI	41
4.1 Optimasi Produksi Metabolit.....	41
4.2 Karakterisasi <i>Cell free supernatant</i> netral	42
4.3 Purifikasi Parsial Bakteriosin	43
4.4 Karakterisasi Metabolit (enterocin)	44
4.5 Identifikasi Gen Penyandi Enterocin	46
BAB V PENUTUP	49
DAFTAR PUSTAKA	50
BIODATA PENULIS	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1. Pemanfaatan BAL	2
Gambar 1. 2. Mekanisme sintesis bakteriosin oleh BAL, RR: respon regulator, P: peptida, 1. Bakteriosin, 2. Peptida penginduksi, 3. Leader peptida, 4. Pra-bakteriosin dan 5. Pre peptida penginduksi.....	9
Gambar 2. 1. Isolasi BAL Probiotik.....	14
Gambar 3. 1. Morfologi Koloni E. Faecalis (a) dan Sel E. faecalis (b) yang diisolasi dari susu Kerbau Belang Toraja	31
Gambar 3. 2. Pertumbuhan Isolat E.faecalis dari susu Kerbau Belang Toraja pada media Blood Agar Plate.....	33
Gambar 3. 3. Mekanisme kerja bakteriosin	36
Gambar 3. 4. Struktur gen yang terlibat dalam sintesis bakteriosin	38
Gambar 4. 1. Gel SDS-PAGE enterocin, marker 5 kDa (b) Gel gel SDS-PAGE terhadap patogen uji	46

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1. Isolat BAL, sumber dan peranannya sebagai antimikroba.....	5
Tabel 1. 2. Perbedaan antibiotik dan bakteriosin	10
Tabel 2. 1. Komposisi PCR mix.....	19
Tabel 2. 2. Amplifikasi sekuens 16S rDNA.....	20
Tabel 2. 3. Hasil identifikasi BAL dari Susu Kerbau Belang Toraja.....	27
Tabel 3. 1. Enterosin yang digunakan sebagai pengawet pangan.....	34
Tabel 3. 3. Bakteriosin yang diproduksi oleh Genus Enterococcus	37
Tabel 4. 1. Pasangan Primer Gen Penyandi Enterocin.....	48

BAB I

PROBIOTIK

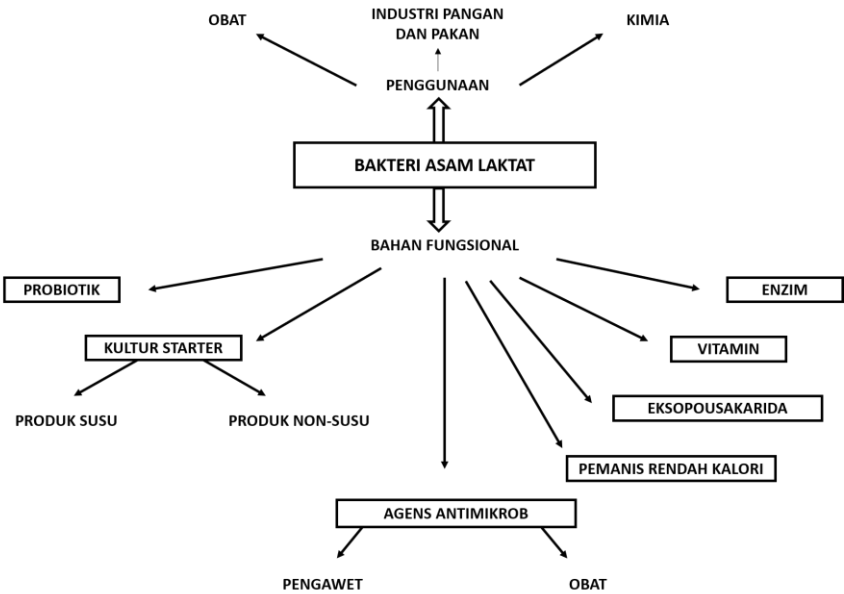
1.1 Latar Belakang

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang berbentuk bulat (coccus) dan batang (Bacil), gram positif, tidak bergerak, tidak menghasilkan spora, dan katalase negatif. Bakteri asam laktat dalam pertumbuhannya memerlukan karbohidrat, asam amino, dan vitamin. Fermentasi dari karbohidrat secara homo atau heterofermentatif akan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhirnya. Bakteri asam laktat terbagi menjadi famili yaitu *Streptococcaceae* dan *Lactobacillaceae*. *Streptococcaceae* adalah kelompok BAL yang berbentuk kokus atau bulat, contohnya Genus *Streptococcus* (*Enterococcus*), *Leuconostoc*, dan *Pediococcus*, sedangkan *Lactobacillaceae* adalah kelompok BAL yang berbentuk batang. Contoh genus yaitu *Lactobacillus* (Fachrial et al., 2022).

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang aman (*Generally Recognized As Safe*- GRAS) dan beberapa diantaranya termasuk golongan probiotik. Konsep probiotik pertama kali dikenalkan oleh Metchnikoff. Namun, probiotik yang berasal dari kata pro-bios yang artinya untuk kehidupan dikenalkan oleh ilmuwan Yunani yaitu Kollath pada tahun 1953. Kemudian di tahun 1954, Ferdinand Vergin mengenalkan probiotik sebagai suatu mikrobiom yang memiliki senyawa aktif untuk kesehatan.

Probiotik adalah mikroba yang apabila dikonsumsi akan memberikan efek positif bagi kesehatan manusia, misalnya menyeimbangkan mikroba atau flora normal di saluran

pencernaan, mencegah sekaligus mengobati penyakit saluran cerna karena infeksi patogen. Bahkan beberapa penelitian juga mengungkapkan bahwa penggunaan probiotik dapat menurunkan kolesterol jahat di dalam darah, mengobati diare, meningkatkan sistem imun, mencegah kanker pada usus dan kolon. Hal ini mengindikasikan bahwa probiotik adalah suatu pangan fungsional dan dapat meningkatkan derajat kesehatan manusia. Pemanfaatan BAL seperti terlihat pada gambar 1.1 berikut.



Gambar 1. 1. Pemanfaatan BAL

Bakteri asam laktat golongan probiotik disarankan berasal dari manusia karena akan digunakan lagi oleh manusia untuk kesehatan, namun beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa *Bifidobacterium animalis* dan *Lactobacillus plantarum* yang berasal dari hewan dan tumbuhan, ternyata dapat digunakan sebagai probiotik. Hal

ini berarti bahwa BAL probiotik dapat bersumber dari mana saja. Seperti yang telah diungkapkan bahwa tidak semua BAL adalah probiotik, maka menurut *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO), BAL harus memenuhi beberapa kriteria untuk dapat disebut sebagai probiotik, seperti dapat menjaga dan memperbaiki mikroorganisme dalam saluran cerna, resisten terhadap kondisi asam lambung, tahan terhadap kondisi garam empedu, tidak bersifat patogen, mampu membentuk koloni dalam saluran cerna, dan mampu menghasilkan senyawa antimikrobia untuk menghambat mikrobia patogen. Selain itu, BAL probiotik juga harus mudah diaplikasikan pada makanan dan mampu bertahan hidup selama proses pengolahan makanan seperti pemanasan dan pendinginan/pembekuan. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa peranan probiotik bagi kesehatan terbagi menjadi: 1) fungsi protektif, artinya BAL probiotik mampu menghambat mikrobia patogen pada saluran cerna, 2) fungsi sistem imun, artinya BAL probiotik dapat meningkatkan imunitas tubuh dengan cara menginduksi terbentuknya IgA, aktivasi makrofag, dan menginduksi *poresponsiveness* akibat antigen yang terdapat dalam pangan, dan 3) fungsi metabolit, artinya metabolit yang dihasilkan oleh BAL probiotik, dapat membantu pasien, misalnya mampu mendegradasi laktosa pada suatu produk pangan, sehingga dapat digunakan oleh orang yang menderita *lactose intolerance*.

Kemampuan BAL sebagai probiotik dikarenakan BAL tersebut memiliki senyawa antimikrobia seperti asam laktat, asam Perbedaan antibiotik dan bakteriosin asetat, dan bakteriosin. Antimikroba seperti bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL probiotik telah dilaporkan dapat digunakan untuk mencegah pertumbuhan patogen penyebab infeksi saluran

cerna seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio*, *Bacillus cereus* maupun *Staphylococcus aureus*.

Menilik dari kemampuan BAL probiotik dalam menghasilkan metabolit sekunder dan peranannya sebagai antimikroba, maka beberapa penelitian akhir-akhir ini menyarankan penggunaan bakteriosin yang dihasilkan oleh kelompok bakteri tersebut sebagai alternatif pengganti antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang telah resisten terhadap obat (*Multi Drug Resistant* atau MDR). Resistensi adalah kondisi bakteri yang telah kebal terhadap antibiotik, sehingga akan memengaruhi efektivitas dan biaya pengobatan. Penggunaan antibiotik juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dapat merusak flora normal usus, sehingga pemakaian bakteriosin dari BAL probiotik dianggap sebagai solusi menangani kasus tersebut. Selain itu, bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL probiotik telah dilaporkan banyak digunakan sebagai biopreservatif atau pengawet, karena bersifat lebih aman. Bakteriosin yang saat ini paling terkenal nisin. Nisin adalah polipeptida bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Nisin banyak digunakan sebagai pengawet keju untuk mencegah kontaminasi dari bakteri patogen *Staphylococcus aureus*.

Probiotik yang saat ini paling terkenal dan telah banyak dikonsumsi yaitu *Lactobacillus casei* strain shirota. Bakteri ini terdapat dalam minuman yaqult. Selain terdapat pada yaqult, beberapa penelitian juga telah menyebutkan bahwa pangan olahan seperti yoghurt, keju ataupun pangan tradisional seperti kefir, tempoyak, dangke, dadih dan lain lainnya, ternyata juga mengandung BAL probiotik. Menurut WHO, jumlah strain probiotik pada suatu produk makanan

disarankan minimal sebesar 10^6 CFU/g atau setara dengan 10^8 CFU/g konsumsi probiotik. Beberapa BAL probiotik yang saat ini telah banyak digunakan adalah *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus* dan *Leuconostoc*.

a. Sumber isolat BAL Probiotik

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, bahwa BAL dapat diisolasi dari berbagai habitat, salah satunya dari susu (Alang et al., 2019). Beberapa hasil penelitian yang menemukan BAL dari susu beserta peranannya terhadap mikroba seperti terlihat pada tabel 1.1.

Tabel 1. 1. Isolat BAL, sumber dan peranannya sebagai antimikroba

Sumber	Jenis BAL	Mikroorganisme uji	Pustaka
Susu unta (Mesir)	1. <i>Enterococcus faecium</i> . 2. <i>Lactobacillus lactis</i>	1. <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> dan <i>Vibrio</i> 2. <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> dan <i>Vibrio</i> (1,8)	(Hamed & Elattar, 2013)
Susu Sapi (Iran)	<i>Pediococcus shahsavar</i> , <i>Enterococcus alborz</i> , <i>Pediococcus sigal</i> dan <i>Enterococcus faecalis</i>	-	(Forhad et al., 2015)

Sumber	Jenis BAL	Mikroorganisme uji	Pustaka
Susu Kerbau (Karnataka India)	a. <i>L. acidophilus</i> b. <i>L. rhamnosus</i> c. <i>Bifidobacterium</i>	a. <i>E. coli</i> (S), <i>S. aureus</i> (S), <i>B. subtilis</i> (R) b. <i>E. coli</i> (S), <i>S. aureus</i> (S), <i>B. subtilis</i> (S) c. <i>E. coli</i> (S), <i>S. aureus</i> (S), <i>B. subtilis</i>	(Shafakatullah & Chandra, 2014)
Susu Kerbau (Sumatra Utara)	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. Lactis</i>	-	(Rizqiati, H. et al., 2015)
Susu Kerbau (Bangladesh)	<i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>S. typhi</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> sp.	(Forhad et al., 2015)
Susu Kuda Sumbawa	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SKG34	<i>E. coli</i> , <i>S. tiphy</i> , <i>S. aureus</i>	(Sujaya et al., 2016)
Susu kambing etawah	<i>L. curvatus</i>	<i>S. aureus</i> dan <i>S.typhi</i>	Fitria & Ardyati, 2014

Sumber	Jenis BAL	Mikroorganisme uji	Pustaka
			(Fitria & Ardyati, 2014)
Susu Kambing (Brazil)	<i>Lactococcus</i> dan <i>Enterococcus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(Perin & Nero, 2014)
Sapi, kambing dan unta (Madinah)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> ,	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i>	(Sharaf & Harbi, 2011)
Susu sapi, kambing, domba dan unta (India)	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	-	Sharma dkk. (2013) (Sharma, 2013)

b. Antimikroba BAL Probiotik

Ada dua macam antimikroba yang dihasilkan oleh BAL probiotik yaitu asam organik (asam asetat dan asam laktat) dan bakteriosin. Antimikroba tersebut merupakan hasil fermentasi dari BAL. Bakteriosin merupakan peptida antimikroba (*antimicrobe peptide*, AMP) yang dihasilkan oleh golongan BAL dan disintesis di dalam ribosom.

➤ Asam organik

Asam organik pada golongan BAL yaitu asam asetat dan asam laktat. Kedua asam organik ini digunakan dalam pangan untuk mencegah pertumbuhan mikroba. Asam organik adalah senyawa yang sifatnya asam, yang dapat menurunkan pH lingkungan sehingga mencegah pertumbuhan mikroba yang intoleran terhadap kondisi pH. Asam asetat (CH_3COOH) dan asam laktat ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) bekerja dengan cara menghasilkan ion hidrogen yang dapat mengganggu metabolisme esensial mikroba.

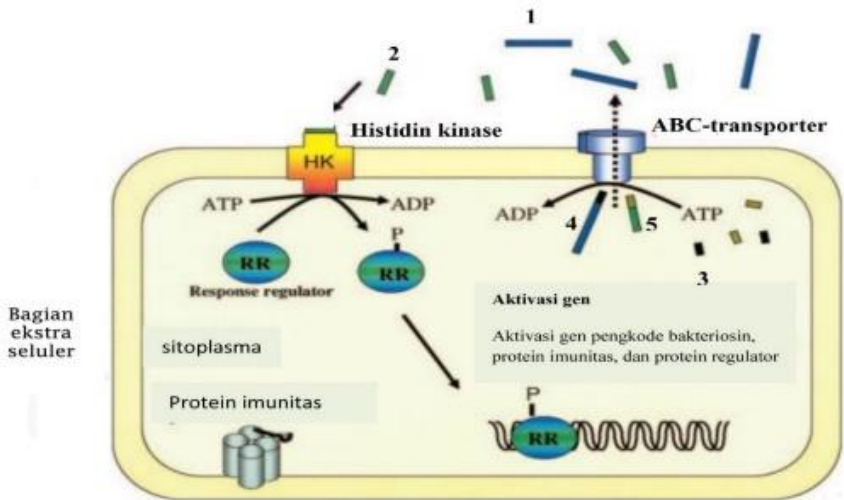
➤ Bakteriosin

Bakteriosin adalah peptida yang dihasilkan oleh BAL dan bersifat sebagai antimikroba. Senyawa ini memiliki rantai yang pendek, tahan terhadap panas, tidak berbau, tidak berwarna, dan diproduksi pada fase pertumbuhan log hingga fase stasioner. Proses atau mekanisme sintesis (pembentukan bakteriosin) seperti terlihat pada gambar 1.2.

Bakteriosin merupakan antimikroba yang bersifat bakterisidal ataupun bakteriostatik terutama bakteri yang *closed related* atau berkerabat dengan BAL penghasil bakteriosin. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dapat menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes*, *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* dan *proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*,

enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) maupun *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif seperti *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli* (Mohankumar & Murugalatha, 2011; Yang et al., 2014).

Beberapa contoh bakteriosin yang telah dikarakterisasi yaitu plantaricin yang diisolasi dari *Lactobacillus plantarum*. Plantarisin adalah pengawet makanan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk makanan dan bakteri patogen. Selain plantaricin, juga ada nisin.



Gambar 1. 2. Mekanisme sintesis bakteriosin oleh BAL, RR: respon regulator, P: peptida, 1. Bakteriosin, 2. Peptida penginduksi, 3. Leader peptida, 4. Pre-bakteriosin dan 5. Pre peptida penginduksi
Sumber: (Alvarez-Cisneros & Espuñes, 2011)

Nisin adalah bakteriosin yang diisolasi dari *Lactobacillus lactis*, dan selama ini telah digunakan dalam mengawetkan keju. Berdasarkan hal tersebut, maka beberapa peneliti menyebutkan bahwa bakteriosin yang di hasilkan oleh BAL probiotik dapat digunakan untuk menggantikan antibiotik, terutama pada bakteri yang telah mengalami MDR (*Multi Drug Resisten*). Selain itu, juga dilaporkan bahwa bakteriosin mudah didegradasi oleh proteolitik, sehingga aman bagi pencernaan apabila bakteriosin tersebut digunakan dalam pangan. Perbedaan antara antibiotik dan bakteriosin dapat dilihat pada tabel 1.2.

Tabel 1. 2. Perbedaan antibiotik dan bakteriosin

Karakteristik	Bakteriosin	Antibiotik
Aplikasi	Makanan dan klinik	Klinik
Sintesis	Ribosomal	Metabolit sekunder
Stabilitas terhadap suhu	Tinggi	Rendah
Warna/rasa/bau	Tidak	Ya
Bentuk tindakan (target)	Membentuk pori pada membran sel, menghambat biosintesis dindind sel	Membran sel atau target intraselular

Karakteristik	Bakteriosin	Antibiotik
Toksik terhadap sel eukaryot	Relatif aman	Toksik
Degradasi enzim proteolitik	Tinggi	Hampir tidak
Kisaran pH	Luas	Sempit/kecil

Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yang didasarkan pada berat molekul bakteriosin itu sendiri.

1. Kelas I lantibiotik, yaitu bakteriosin yang tersusun dari asam amino lantionin dan metillantionin. Ukuran berat molekul lantibiotik yaitu 2 hingga 4 kDa. Mekanisme kerja lantibiotik yaitu membentuk pori dengan cara merusak integritas membran sel pada sitoplasma .
2. Kelas II non lantibiotik, berukuran kecil yaitu <10kDa, tidak mengandung lantionin dan bersifat tahan panas. Mekanisme kerja non lantibiotik yaitu mengganggu permeabilitas membran sehingga terbentuk pori pada membran sitoplasma.
3. Kelas III bakteriosin, memiliki ukuran >30 kDa.

Salah satu jenis bakteri asam laktat yang ditemukan di Indonesia yaitu *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini diisolasi dari hewan endemik di Indonesia yaitu Sapi Bali (Gede et al., 2017; Sujaya et al., 2016) dan Kerbau Belang Toraja (Alang, 2019a).

1.2 Permasalahan dan Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka permasalahan dari yang dikaji dalam tulisan ini adalah jenis BAL apakah yang ditemukan dari susu Kerbau Belang Toraja, dan apakah isolat tersebut dapat berperan sebagai probiotik. Tujuan penulisan monograf ini adalah mengisolasi dan BAL dari susu Kerbau Belang Toraja dan mengidentifikasi spesies serta karakternya sebagai probiotik.

BAB II

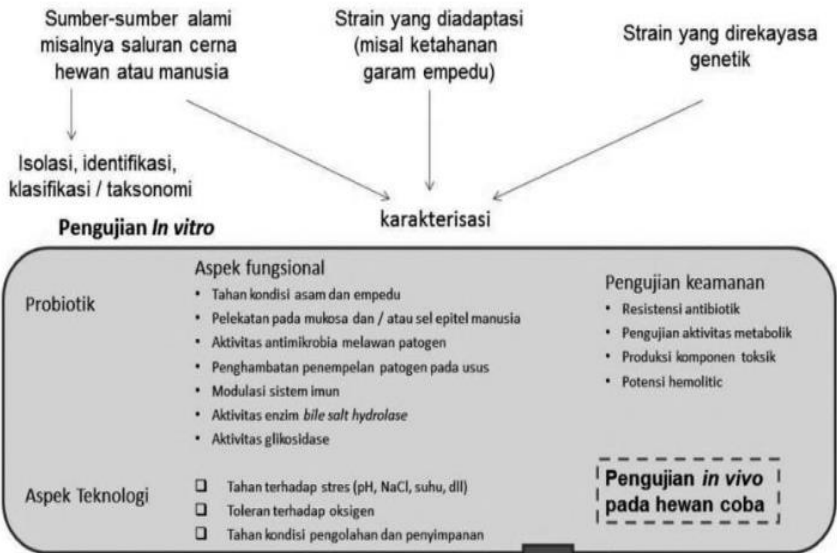
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAL SEBAGAI PROBIOTIK

Pada BAB ini, diuraikan langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan BAL probiotik dari susu Kerbau Belang Toraja, meliputi isolasi BAL dari sampel lalu dilanjutkan dengan pengujian karakter probiotik. (Uraian ini diambil dari kegiatan yang telah dilakukan oleh penulis selama melakukan penelitian disertasi).

2.1 Isolasi BAL dari susu

Mengisolasi BAL bukanlah hal yang sulit, karena habitat bakteri tersebut tersebar secara luas, contohnya di susu (Hamzah & Kadim, 2018; Silveti et al., 2014, 2019). Meskipun cenderung mudah ditemukan, namun tidak semua bakteri yang hidup pada susu adalah BAL, sehingga perlu dilakukan pemurnian untuk mendapat isolat tersebut. Selain itu, tidak semua BAL merupakan probiotik. Sejumlah karakter harus dimiliki bakteri tersebut agar dapat diklaim sebagai probiotik.

Berdasarkan hal tersebut, maka pada bab ini akan diuraikan metode yang dilakukan untuk mendapatkan BAL yang potensial digunakan sebagai probiotik. Sampel yang digunakan yaitu susu Kerbau Belang Toraja. Untuk memudahkan memahami, maka dijabarkan dalam bentuk flowchart seperti yang terlihat pada gambar 2.1. berikut.



Gambar 2. 1. Isolasi BAL Probiotik

a. Persiapan Alat dan Bahan

Dalam melakukan isolasi, langkah awal yang perlu dilakukan yaitu menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses pengerjaan. Alat dan bahan yang dipersiapkan, diantaranya:

1. Kertas alkohol, digunakan untuk membersihkan ambing kerbau
2. Botol ulir steril. Botol ini digunakan untuk menampung susu yang telah diperoleh dari hewan target
3. Cool box, sebagai tempat penyimpanan botol yang telah berisi susu
4. NaCl konsentrasi 0,86 %
5. Media MRSA dan MRSB
6. Alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer
7. Inkubator, tempat menginkubasi biakan.

b. Pengambilan susu dari hewan

Salah satu hewan penghasil susu yaitu Kerbau Belang Toraja, yang merupakan hewan khas yang ada di Kabupaten Toraja Sulawesi Selatan. Meskipun bukan hewan perah, namun beberapa masyarakat biasa mengkonsumsi susu dari hewan ini. Beberapa ahli telah menyatakan bahwa susu murni (*raw milk*) dapat menghasilkan BAL, namun tidak semua BAL tersebut dapat bersifat sebagai probiotik. Susu yang telah diperoleh dari susu kerbau belang selanjutnya dilakukan pengenceran dan ditanam pada media spesifik BAL, yaitu MRSA.

c. Isolasi BAL probiotik

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari lingkungan, dapat ditumbuhkan di laboratorium menggunakan medium spesifik, yaitu MRSA (*De Mann Rogosa Sharpe Agar*) dan MRSB (*De Mann Rogosa Sharpe Broth*).

Isolas BAL dilakukan menurut menurut (Eid et al., 2016; Reuben et al., 2020; Vanniyasingam et al., 2019), dengan cara membuat pengenceran 10^{-1} yaitu mengambil susu segar sebanyak 25 mL, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL NaCl 0,86 %. Dari pengenceran tersebut, lalu dibuat pengenceran 10^{-2} dengan cara mengambil satu mL suspensi pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL NaCl 0,86 %. Selanjutnya dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} .

Masing-masing pengenceran susu tersebut kemudian diinokulasikan secara *pour plate* yaitu dengan cara mengambil 0,1 mL dari masing-masing pengenceran, lalu dimasukkan ke dalam Cawan petri

dan ditambahkan dengan medium MRSA yang mengandung CaCO_3 , lalu dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Sampel selanjutnya diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama dua hari.

Setiap isolat yang tumbuh dan menghasilkan *clear zone* atau zona bening disekitar koloni, lalu dimurnikan secara *spread plate*, yaitu mengambil satu ose koloni, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang 9 mL NaCl 0,86 % dan disebut sebagai pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya dibuat pengenceran hingga 10^{-6} . Masing-masing pengenceran selanjutnya diambil 0,1 mL dan disebar pada permukaan Cwan petri yang telah berisi MRSA padat. Proses homogen dilakukan dengan bantuan *spreader*. Biakan selanjutnya diinkubasi 37°C selama dua hari.

Semua isolat yang tumbuh dari hasil pemurnian selanjutnya dilakukan pewarnaan gram dan di uji katase serta aktivitas oksidasenya. Langkah-langkah dalam pewarnaan gram, yaitu:

1. Objek dan cover glass dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol, seteah itu dilewatkan diatas spirtus sebanyak 3-5 kali
2. Mengambil 1 ose biakan BAL, dan diletakkan diatas permukaan objek glass, selanjutnya diratakan, dan dikeringanginkan
3. Selanjutnya dilakukan fiksasi diatas nyala api spirtus hingga sel mati.
4. Menambahkan pewarna gram A (*cristal violet*) pada preparat, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan beberapa saa

5. Menambahkan pewarna B (lugol) pada preparat, lalu didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan
6. Menambahkan dengan pewarna Gram C hingga nampak pucat selama 30 menit, setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan
7. Menambahkan dengan cat penutup (safranin) dan dibiarkan selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan
8. Mengamati hasil pewarnaan di bawah mikroskop

Langkah-langkah dalam uji katalase, yaitu:

1. Mengambil biakan menggunakan ose dengan cara aseptis
2. Menggores biakan di atas Cawan Petri
3. Kultur lalu ditetesi dengan H₂O₂ 3%

Ciri khas BAL yaitu bersifat Gram positif, katalase dan oksidase negatif. Semua isolat lalu *distreak* dalam tabung reaksi MRSA miring untuk identifikasi spesies dan uji karakter probiotik.

d. Ekstraksi DNA dan Identifikasi Molekuler Isolat BAL

Isolat BAL dapat diekstraksi dengan menggunakan kit atau secara manual. Pada tahap ini, ekstraksi dilakukan menggunakan *i-genomic Soil DNA Extraction Mini Kit* yang telah dimodifikasi, dengan cara mengambil Kultur BAL agar miring umur 24 jam sebanyak 5 ose dan dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi 50 µL aquades steril, selanjutnya dipipetting agar homogen.

Suspensi selanjutnya ditransfer ke *grinder tube* dan ditambahkan 400 µL buffer EG, lalu dihomogenkan dengan cara divortex menggunakan kecepatan

maksimum selama 20 menit. Suspensi selanjutnya disentrifus selama satu menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Lapisan bawah bening selanjutnya dipindahkan ke tabung mikro steril, selanjutnya ditambahkan 100 μ L *buffer* EPT lalu divortex selama lima menit, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam suhu dingin, lalu dilanjutkan dengan dengan sentrifus 13.000 rpm selama tiga menit. Supernatan lalu diambil dan dimasukkan dalam tabung mikro dan ditambahkan 300 μ L *buffer* EB, kemudian *diinverted* sebanyak enam kali. Suspensi selanjutnya ditambahkan dengan 300 μ L etanol absolut, *diinverted* lagi sebanyak enam kali dan dilanjutkan dengan *spindown*.

Suspensi lalu diambil 800 μ L dan dimasukkan ke *spin colloumn*, kemudian dilanjutkan dengan sentrifus 13.000 rpm selama satu menit. Filtrat dibuang dan disentrifus 13.000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* dibuang kemudian diganti dengan yang baru. Selanjutnya ditambahkan 700 μ L *Buffer* EWA lalu disentrifus 13.000 rpm selama satu menit, kemudian ditambahkan 700 μ L *Buffer* EWB, lalu disentrifus 13.000 rpm selama satu menit. Filtrat lalu dibuang dan disentrifus lagi dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit, agar DNA yang diperoleh benar-benar bersih dari etanol.

Spin colloumn dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan dengan 50 μ L *buffer* EE. selanjutnya diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang dalam kondisi penutup tabung mikro dibiarkan terbuka agar sisa etanol dapat menguap. Setelah itu, tabung mikro ditutup dan disentrifus 13.000 rpm selama satu menit,

dan spin kolom dibuang. DNA yang diperoleh selanjutnya disimpan untuk identifikasi.

Identifikasi dilakukan menurut (Liu et al., 2012; Taye et al., 2021) dengan menggunakan primer 16S rDNA 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3') dan 1492r (5'CTACGGCTACCTTGTACGA-3'). Volume PCR *mix* yaitu 50 μ L, dengan komposisi seperti pada tabel 2.1.

Tabel 2. 1. Komposisi PCR mix

Komposisi PCR Mix	Konsentrasi	Volume (50 μ L)
PCR master mix		25 μ L
F	10 pmol	2 μ L
R	10 pmol	2 μ L
ddH2O		19 μ L
DNA <i>Template</i>	50 ng	2 μ L

Sekuens 16S rDNA lalu diamplifikasi menggunakan program PCR 35 siklus, dengan program PCR seperti terlihat pada tabel 2.2. Amplikon 16S rDNA hasil PCR lalu dielektroforesis pada gel agarosa 1,5 %, menggunakan *marker* 10.000 kb *ladder* dan ditambahkan pewarna 2 μ L *ethidium bromide*. Setelah elektroforesis, agar selanjutnya divisualisasi menggunakan UV-*transluminator*.

Tabel 2. 2. Amprifikasi sekuens 16S rDNA

Amplifikasi	Suhu	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	94 °C	5 menit	
Denaturasi	94 °C	1 menit	35x
<i>Annealing</i>	54 °C	30 detik	35x
Ekstensi	72 °C	1 menit	35x
Ekstensi akhir	72 °C	7 menit	

Pembuatan agarosa 1,5 % dilakukan dengan cara: menimbang Agarosa sebanyak 0,15 g, lalu dilarutkan dengan buffer TBE 15 mL dalam erlenmeyer dan ditutup dengan plastik wrap kemudian dipanaskan dalam *microwave* hingga bening. Selanjutnya ditambahkan dengan *Ethidium bromide* (EtBr) sebanyak 1 µL, kemudian dihomogenkan dan tuang ke cetakan agar yang telah diberi sisiran. Proses elektroforesis dilakukan dengan cara meletakkan gel agarosa kedalam *chamber* elektroforesis, lalu ditambahkan buffer TBE hingga gel terendam. Well pada agar lalu diisi dengan 3 µL ampikon. Kemudian *dirunning* 100 volt selama 30 menit. Gel diangkat dan diletakkan dalam UV transluminator untuk visualisasi.

Ampikon 16S rDNA lalu dipurifikasi dan disekuensing di Firstbase Malaysia. Homologi 16S rDNA dianalisis dengan data sekuen 16S rDNA dari *genebank* dan *disubmit* ke NCBI. Data sekuen 16S rDNA isolat *dialigment* bersama data sekuen isolat acuan untuk konstruksi pohon filogeni dan dianalisis hubungan filogeninya menggunakan *Neighbor Joining* dengan

bootstrap 1000 replikasi menggunakan program MEGA (Abubakr & Al-Adiwish, 2017; Liu et al., 2012).

2.2 Skrining Kandidat Probiotik

Skrining probiotik dapat dilakukan dengan melihat sifat patogenisitasnya, ketahanan pada asam lambung dan garam empedu, kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba dan uji kepekaan terhadap antibiotik.

a. Uji Patogenitas

Uji patogenitas digunakan untuk mengetahui apakah suatu bakteri bersifat patogen atau tidak dengan melihat kemampuannya dalam melisis sel darah. Uji patogenitas dilakukan dengan menggunakan *blood agar plate*. Uji ini disebut juga uji hemolisis darah. Hasil pengujian patogenitas pada *blood agar plate* akan menampilkan hasil setelah inkubasi berupa β -haemolysis (*clear zone*) yang artinya sangat patogen, α -hemolytic (*green zone*) yang artinya bersifat patogen, atau γ -hemolytic (tanpa *clear zone*) yang artinya non patogen atau bersifat aman.

Pengujian BAL kali ini menggunakan metode *streak*, yaitu isolat yang tumbuh pada medium MRS *distreak* pada *blood agar plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sifat patogenitas dilakukan dengan melihat aktivitas hemolisis yang terbentuk. Bakteri asam laktat kandidat probiotik merupakan bakteri yang tidak patogen, sehingga harus bersifat non atau γ -hemolytic.



b. Uji Ketahanan Terhadap Kondisi Asam dan Garam Saluran Cerna

Bakteri asam laktat kandidat probiotik merupakan bakteri yang tahan dan mampu bertahan hidup pada kondisi ekstrim saluran pencernaan seperti kondisi asam dan garam empedu saluran cerna. Pengujian ketahanan BAL kandidat probiotik pada kondisi asam saluran cerna dapat dilakukan dengan menumbuhkan BAL pada medium *MRS broth* asam pH 2,3 dan 4 sesuai kondisi asam saluran cerna. Sedangkan ketahanan BAL kandidat probiotik pada kondisi garam saluran cerna dapat dilakukan dengan menggunakan *MRS broth* yang mengandung *oxgall bile salt* 0,3 %, 0,5 %, dan 1,0 % sesuai kondisi garam saluran cerna.

Pengujian BAL pada kondisi asam dan garam saluran cerna, dilakukan menurut metode (Abushelaibi et al., 2017; Angmo et al., 2016; Reuben et al., 2020) dengan cara: menumbuhkan BAL pada *MRS broth overnight* hingga densitas 10^7 sel/mL (fase logaritmik),

lalu diambil sebanyak 1 mL dan diinokulasikan ke dalam MRS *broth* dengan pH 2, 3, dan 4, selanjutnya diinkubasi selama 3 dan 5 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, dilanjutkan dengan menumbuhkan masing-masing perlakuan pada media MRSA plate secara *pour plate* lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 37 °C.

Pengujian BAL pada kondisi garam dilakukan dengan cara menumbuhkan BAL pada MRS *broth* hingga densitas 10^7 sel/mL (fase logaritmik), lalu diambil sebanyak 1 mL dan diinokulasikan ke dalam MRS *broth* yang mengandung *oxgall bile salt* 0,3 %, 0,5 %, dan 1,0 % (v/v) selanjutnya diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, dilanjutkan dengan menumbuhkan masing-masing perlakuan pada media MRSA plate secara *pour plate* lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 37 °C.

Kemampuan BAL kandidat probiotik hidup pada kondisi ekstrem saluran cerna dinyatakan dalam SR atau *Survival Rate*, dihitung menggunakan rumus (Lo Curto et al., 2011; Oudhuis et al., 2011; Reuben et al., 2020).

$$SR = \frac{\text{Log CFU } N_1}{\text{Log CFU } N_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

SR = *Survival rate*

N_1 = Total seluruh bakteri setelah perlakuan

N_0 = Total seluruh bakteri sebelum perlakuan

c. Kemampuan Isolat BAL Menghasilkan Senyawa Antimikroba

Bakteri asam laktat kandidat probiotik harus mampu menghasilkan senyawa antimikroba, sehingga mampu melawan bakteri patogen yang ada pada saluran cerna. Pengujian aktivitas antimikroba isolat BAL dari susu Kerbau Belang Toraja dilakukan menurut (Eid et al., 2016) secara *disk diffusion method*.

Bakteri asam laktat selanjutnya dikultur pada medium MRS *broth* 37 °C *overnight* hingga densitas 10^7 sel/mL (fase logaritmik), sedangkan bakteri patogen saluran cerna ditumbuhkan pada medium *Nutrient Broth* 37 °C *overnight* hingga densitas 10^6 sel/mL (fase logaritmik).

Sebanyak 100 μ L patogen cerna ditumbuhkan pada NA *plate* yang telah padat secara *spread plate*, lalu diinkubasi pada suhu 4 °C selama satu jam untuk memperlambat pertumbuhannya.

Isolat BAL densitas 10^7 sel/mL diteteskan ke *blank disk* sebanyak 50 μ L dan dikeringkan. Setelah itu, *blank disk* diletakkan dipermukaan cawan petri yang berisi patogen cerna, lalu diinkubasi selama 30 menit suhu 4 °C.

Aktivitas antimikroba isolat terhadap bakteri patogen dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening disekeliling disk. Aktivitas antimikroba dikategorikan menjadi tinggi (≥ 15), sedang/ intermediate (≥ 12), dan rendah (≥ 6) berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk.

d. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik

Uji kepekaan terhadap antibiotik dilakukan untuk melihat sensitivitas BAL terhadap antibiotik. Bakteri asam laktat kandidat probiotik harus sensitif terhadap berbagai antibiotik demi menghindari transfer gen saat lisis dalam usus.

Kepekaan terhadap antibiotik dilakukan menggunakan metode *disk diffusion* pada Cawan Petri berdasarkan manufacturer's instructions *disk antibiotic* (oxoid), yaitu 100 μ L (densitas CFU 10^6 sel/mL) *dispread* pada MRSA *plate*, selanjutnya *disk* antibiotik diletakkan pada permukaan MRSA *plate* yang mengandung BAL, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kepekaan BAL tersebut terhadap antibiotik dilihat dengan terbentuknya zona hambat disekitar disk, dengan mengacu pada kriteria *National Commitee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)* dengan kategori resisten (R), intermediat (I) dan sensitif (S).

e. Aktivitas Antimikrobia Berbagai Metabolit (Supernatan) BAL

Aktivitas antimikroba metabolit BAL terhadap patogen diuji menurut (Lo Curto et al., 2011; Reuben et al., 2020).

Isolat yang telah ditumbuhkan pada 10 mL MRS *broth*, suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. pH supernatan lalu dinetralkan dan disaring menggunakan milipore diameter pori 0,22 μ m. Metabolit lalu disimpan untuk uji antimikroba.

Uji aktivitas antimikroba dari *supernatan free cell* (CFS) atau metabolit dilakukan dengan metode *disk diffusion* pada Cawan Petri Plate yang berisi NA. Patogen uji ditumbuhkan pada media NB suhu 37 °C hingga densitas 10^6 sel/mL.

Patogen sebanyak 100 µL *dispread* pada permukaan NA, dan diinkubasi suhu 4 °C selama satu jam untuk menekan pertumbuhannya. *supernatan free cell* (CFS) atau metabolit diambil sebanyak 50 µL dan diteteskan pada *Blank disk*, lalu dikeringanginkan hingga seluruh metablit terserap pada *disk*, kemudian diletakkan diatas permukaan cawan yang berisi patogen, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4 °C. Kultur lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas antimikroba CFS dilihat dengan terbentuknya zona bening disekeliling disk.

Bakteri asam laktat yang telah teridentifikasi berdasarkan data molekuler dan juga memiliki karakter sebagai kandidat probiotik selanjutnya disimpan dalam gliserol 20 % suhu -20 °C untuk uji lanjut.

2.3 Tindak Lanjut Penelitian

Bakteri asam laktat yang diperoleh dari susu Kerbau Belang Toraja diidentifikasi menggunakan primer universal sekuens 16S rDNA. Hasil identifikasi diketahui bahwa isolat tersebut merupakan spesies *Enterococcus faecalis* seperti terlihat pada Tabel 2.3 berikut (setelah dibandingkan dengan sekuens yang ada di gen bank).

Tabel 2. 3. Hasil identifikasi BAL dari Susu Kerbau Belang Toraja

No.	Spesies	% similaritas
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> CGMCC1.2135 ^T	99.84
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 ^T	100
3.	<i>Enterococcus lactis</i> BT159 ^T	96.63
4.	<i>Enterococcus faecium</i> NBRC 100485 ^T	96.89
5.	<i>Enterococcus cecorum</i> ^T	94.49
6.	<i>Enterococcus durans</i> CECT411T ^T	96.72
7.	<i>Enterococcus alcedinis</i> L34 ^T	95.53
8.	<i>Enterococcus mundtii</i> strain: NBRC 100490 ^T	96.55
9.	<i>Enterococcus mundtii</i> strain CECT972T ^T	96.47
10.	<i>Enterococcus sulfureus</i> ATCC 49903 ^T	95.7
11.	<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025 ^T	96.38
12.	<i>Enterococcus caccae</i> strain 2215-02 ^T	97.48
13.	<i>Enterococcus gilvus</i> ^T	96.3
14.	<i>Enterococcus termitis</i> LMG 8895 ^T	97.39
15.	<i>Enterococcus gilvus</i> CR1 ^T	96.39
16.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> VPI 6032 ^T	86.58

Skrining karakter sebagai kandidat probiotik diketahui bahwa isolat *E.faecalis* bersifat non patogen (gamma-hemolysis), tahan pada kondisi asam dan garam saluran cerna, isolat dapat menghambat pertumbuhan patogen uji, sensitif terhadap antibiotik terutama vancomycin dan supernatan (CFS, *cell free supernatant*) yang dihasilkan mampu menekan pertumbuhan mikroba patogen uji yang

digunakan. Penelitian ini sesuai dengan (Sujaya et al., 2016) yang menemukan *Enterococcus faecalis* yang diisolasi dari sapi bali telah terbukti menghasilkan antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan patogen *Propionibacterium acnes* penyebab acne

BAB III

Enterococcus faecalis

3.1 Sejarah Penemuan *E. faecalis*

Enterococcus faecalis adalah golongan BAL, dan merupakan mikroba flora normal di saluran pencernaan hewan ataupun manusia dan juga pada organ genital wanita. Selain itu, seringkali bakteri ini juga ditemukan sebagai flora normal hingga opportunistik pada rongga mulut.

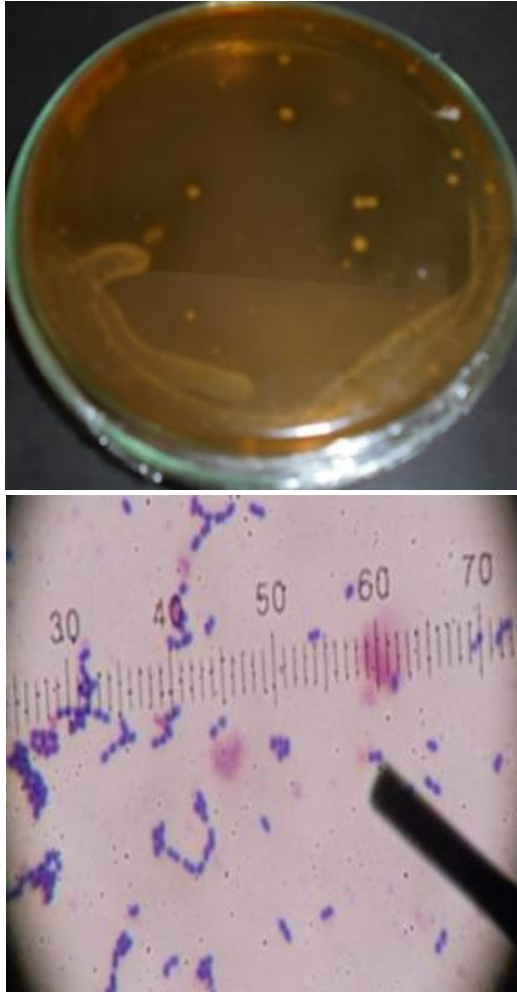
Enterococcus faecalis pertama kali diperkenalkan oleh Thiercelin tahun 1899 dengan nama *Enterocoque*, yang saat itu berujuan untuk mengidentifikasi mikroba di saluran cerna. Kemudian ditahun 1930, *Lancefield* lalu melakukan pengelompokan dengan menggolongkan *Enterococci* sebagai *Streptococci* grup D. Lalu ditahun 1937 oleh Sherman, *Enterococci* digunakan untuk menyebut nama *Streptococci*. Kemudian di tahun 1980, *Enterococci* lalu tidak lagi sebagai kelompok *Streptococcus* tetapi sebagai genus *Enterococcus*, sehingga yang dulunya dikenal sebagai *Streptococcus faecalis*, lalu berubah menjadi *E. faecalis*.

3.2 Karakteristik *Enterococcus faecalis*

Bakteri kelompok ini dapat ditumbuhkan pada medium khusus, yaitu MRS atau M17. Pertumbuhan bakteri pada kedua medium akan menghasilkan ciri morofologi yang sama. Karakteristik koloni *E. faecalis* pada media agar (MRS/M17) yaitu berbentuk bulat, tepi dan permukaan halus, berwarna putih krem dengan diameter 0,5-1 mm. Tepi koloni tidak rata,

elevasi koloni cembung dan konsistensi koloni basah (Gambar 3.1a).

Karakteristik sel *E. faecalis* adalah merupakan gram positif, bentuk selnya yaitu coccus atau bulat yang kadang tunggal ataupun berpasangan menyerupai rantai pendek dengan diameter 0,5-1 um (3.1b). Meskipun *E.faecalis* adalah gram positif, namun dinding sel bakteri ini tidak seperti gram positif pada umumnya yang memiliki tiga lapisan dinding sel (kapsul, peptidoglikan dan teichoid serta polisakarida. Dinding sel pada *E.faecalis* lebih sederhana dengan struktur kimianya yang hanya terdiri dari dua lapisan saja, yaitu peptidoglikan dan membran sitoplasma. Karena tergolong gram positif, maka dinding sel bakteri ini tentu tidak mengandung lipid.



Gambar 3. 1. Morfologi Koloni *E. Faecalis* (a) dan Sel *E. faecalis* (b) yang diisolasi dari susu Kerbau Belang Toraja
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Karakteristik *E. faecalis* yaitu bersifat non motil, oksidase dan katalase negatif dan dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas hingga 50 °C, namun suhu optimum pertumbuhannya adalah 37 °C. Mampu memfermentasi karbohidrat seperti glukosa, rhamnosa, maltosa, laktosa,

sukrosa, D-manitol, dan gliserol serta berbagai jenis karbohidrat lainnya. Bakteri ini tidak membentuk spora, dapat tumbuh pada kisaran lingkungan ekstrem seperti pH rendah atau asam (pH 3-5), kadar garam tinggi (0,5 -1%) dan bersifat fakultatif anaerobik sehingga dapat hidup meskipun lingkungan mengandung oksigen. Pada lingkungan yang mengandung oksigen, bakteri ini akan melakukan respirasi aerobik, namun pada kondisi kekurangan oksigen atau anaerobik sekalipun, bakteri ini akan melakukan respirasi seluler secara anaerobik melalui jalur fermentatif dengan menggunakan senyawa nitrat (NO_3^-) atau sulfat (SO_4^{2-}) sebagai akseptor hidrogen terakhir. Bakteri ini mampu menghasilkan esculinase, α -galactosidase, β -galactosidase, dan hippuricase (Berkiten et al., 2000).

Sebagai tambahan karakter, dilaporkan bahwa bakteri *E.faecalis* dari susu Kerbau Belang Toraja dilaporkan juga sangat sensitif terhadap beberapa antibiotik, diantaranya vancomycin, streptomycin, dan chloramphenicol. Karakter sensitif terhadap antibiotik merupakan salah satu persyaratan BAL sebagai probiotik. Hal ini dikarenakan bila BAL mengandung gen resisten, maka dikhawatirkan akan terjadi transfer gen saat BAL lisis dalam saluran cerna, yang menyebabkan gen resisten berpindah ke flora normal usus, dan menyebabkan flora normal ikut menjadi resisten (Sharma 29016, Alang Probiotik). Selain itu, bakteri ini juga bersifat non atau γ -hemolytic, yang berarti non patogen (Gambar 3.2).



Gambar 3. 2. Pertumbuhan Isolat *E.faecalis* dari susu Kerbau Belang Toraja pada media Blood Agar Plate
(Dokumentasi pribadi, 2019).

Golongan enterococcus dikelompokkan menjadi *E. faecalis* dan *E. Faecium*. Klasifikasi *Enterococcus faecalis* yaitu:

Kingdom : *Bacteria*

Filum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacili*

Ordo : *Lactobacillales*

Famili : *Enterococcaceae*

Genus : *Enterococcus*

Species : *Enterococcus faecalis* (NCBI, 2003)

Faktor virulensi *E.faecalis* dikarenakan bakteri ini memiliki enzim litik, sitotoksin, substansi agregat, *pheromones*, dan asam lipoteik. *Enterococcus faecalis* dapat melekat pada host dikarenakan bakteri ini dapat mengekspresikan dan bersaing dengan jenis bakteri lain.

a. Peranan dan Gen Penyandi Enterocin

Enterocin adalah bakteriosin yang dihasilkan oleh *E.faecalis* dan beberapa penelitian telah melaporkan bahwa senyawa tersebut dapat digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan mikroba patogen (Arqués et al., 2015). Berbagai jenis enterocin yang dihasilkan oleh *E. faecalis* dan *E.faecium* beserta peranannya sebagai pengawet pangan seperti terlihat pada tabel 3.1.

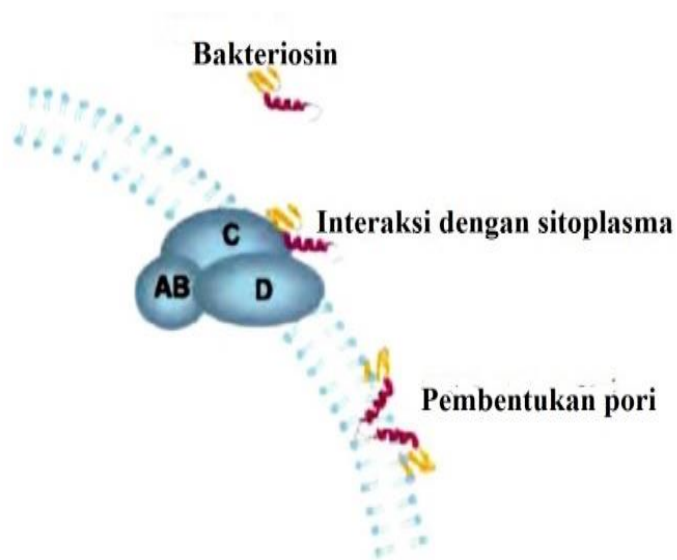
Tabel 3. 1. Enterosin yang digunakan sebagai pengawet pangan

Bakteriosin	Strain produsen	Strain yang dihambat	Pemanfaatan
Enterocin A&B	<i>E. faecium</i> WHE81	<i>Listeria monocytogene</i> s	Keju
Enterocin L50A/B	<i>E. faecium</i> F58	<i>L. monocytogene</i> s	Keju
Enterocin A5-48	<i>E. faecalis</i> A-48-32	<i>Bacillus cereus</i>	Keju keras bebas lemak
Enterocin A5-48	<i>E. faecalis</i> A-48-32	<i>Staphylococcus aureus</i>	Skim milk dan keju lunak
Enterocin 13	<i>E. faecium</i> RZS C13	<i>Lactobacillus</i>	Sosis kering fermentasi (Spanyol)
Enterocin CCM 4231	<i>E. faecium</i> CCM 4231		Sosis kering

Bakteriosin	Strain produsen	Strain yang dihambat	Pemanfaatan
Enterocin A & B	<i>E. faecium</i> CTC 492	<i>Lactobacillus innocua</i>	fermentasi (Spanyol) Sosis kering
Enterocin A & B	<i>E. faecium</i> CTC 492	<i>Lactobacillus sakei</i>	fermentasi Daging babi yang dimasak
Enterocin A	<i>Lactococcus lactis</i> MG 1614	<i>L. monocytogenes</i>	Keju

Sumber: (Alvarez-Cisneros & Espuñes, 2011)

Potensi bakteriosin terhadap mikroba target pada peranannya sebagai antimikroba sangat tinggi, dan aktivitas tertinggi pada strain yang berkerabat dengan bakteri produsen bakteriosin (Borgogna & Yeoman, 2017). Aktivitas bakteriosin sebagai antimikroba karena sifat kationik nya yang berperan saat terjadi interaksi dengan membran sel bakteri target. Hal ini dikarenakan sifat dari membran sel yang bermuatan positif, sedangkan bakteriosin bermuatan negatif (gambar 3.3).



Gambar 3. 3. Mekanisme kerja bakteriosin
Sumber: (Alvarez-Cisneros & Espuñes, 2011)

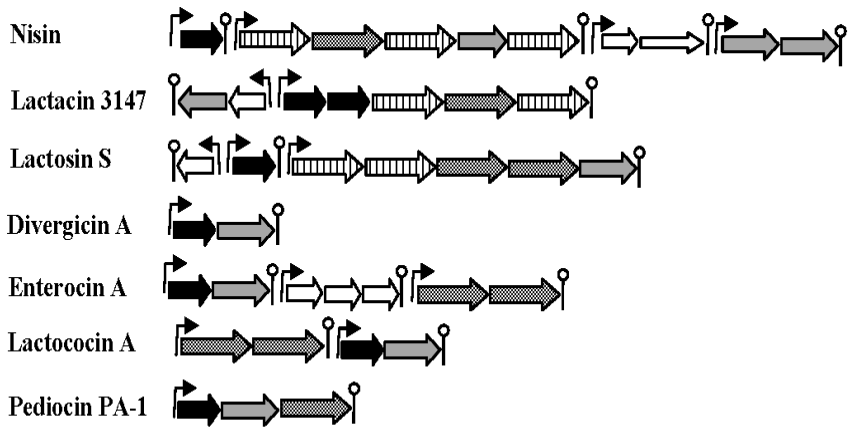
Entetocin yang dihasilkan oleh golongan *Enterococcus* merupakan bakteriosin kelas II non lantibiotik. Jenis-jenis enterocin beserta mikroba penghasilnya terlihat pada tabel 3.3.

Tabel 3. 2. Bakteriosin yang diproduksi oleh Genus Enterococcus

Bacteriosin	Kelas	Mikroorganisme produser
^a Enterocin	II	<i>E. faecium</i> K2B1
^b Enterocin A	IIa	<i>E. faecium</i> CTC492
^b Enterocin CRL35		<i>E. faecium</i> CRL35
^b Enterocin P		<i>E. faecium</i> P
^b Enterocin SE-K4		<i>E. faecalis</i> K-4
^b Enterocin B	IIc	<i>E. faecium</i> T136
^b Enterocin L50 (EntL50A/B)	L50	<i>E. faecium</i> L50
^b Enterocin 1071 (Ent1071A/B)		<i>E. faecalis</i> BFE1071
^b Enterocin Q		<i>E. faecium</i>
^b Enterocin RJ-11		<i>E. faecalis</i> RJ-11
^b Enterocin EJ97		<i>E. faecalis</i> EJ97
^b Enterocin AS-48		<i>E. faecalis</i> S-48

(hasil penelitian disertasi, b. Al-Varez dkk., 2011)

Pembentukan Enterocin diatur oleh gen penyandi enterocin. Gen penyandi tersebut ditemukan pada dalam kromosom ataupun plasmid bakteri Enterococcus dan disintesis di ribosom. Gen penyandi enterocin tersusun atas gen struktural, gen immunitas, regulator gen dan gen prosessing (gambar 3.4).



Structural gene (■); immunity gene (▨); transport and processing genes (▤); regulator genes (▥); promoter (▶); terminator (◀)

Gambar 3. 4. Struktur gen yang terlibat dalam sintesis bakteriosin

Sumber: (Alvarez-Cisneros & Espuñes, 2011)

Ekspresi gen enterocin untuk menghasilkan enterocin sangat diatur oleh kondisi pertumbuhan dari genus *Enterococcus*. Produksi *enterococcus* tersebut dapat dilakukan pada substrat cair dan diatur oleh *quorum sensing*. *Quorum sensing* adalah sistem kontrol pada proses biologi bakteri, seperti transformasi alami genetik, virulensi, sporulasi, dan lain-lain. *Quorum sensing* bakteri Gram positif dominan dimediasi oleh peptida feromon atau IF (faktor induksi). Beberapa faktor yang memengaruhi produksi enterocin yaitu fase pertumbuhan, pH medium pertumbuhan, suhu inkubasi dan komposisi media seperti karbon, nitrogen dan konsentrasi NaCl. Gen yang menyandikan produksi enteroin yaitu *ent A*, *B*, *P*, dan *L50A/B*.

b. Produksi Enterocin

Produksi enterocin dapat dilakukan pada medium cair. Produksi dilakukan melalui beberapa tahapan yang diawali dari fermentasi hingga purifikasi. Purifikasi merupakan pemekatan protein sehingga komponen lain dapat dihilangkan. Purifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut organik, presipitasi penambahan garam dan kromatografi ion. Penambahan garam seperti ammonium sulphat merupakan purifikasi yang paling umum dilakukan untuk memproduksi bakteriosin ataupun enterosin. Hal ini dikarenakan ammonium sulfat mempunyai sifat kelarutan yang tinggi, tidak merusak protein dan harga yang lebih ekonomis.

Penghancuran dinding sel bakteri produsen pada suhu 0-4 °C merupakan langkah awal pada proses ekstraksi enterocin. Setelah tahap tersebut, langkah selanjutnya yaitu salting-in. Salting-in adalah presipitasi atau penambahan ammonium sulfat. Penambahan amonium sulfat pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan penurunan kelarutan protein sehingga terjadi pengendapan. Penambahan garam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan protein memiliki kadar garam tinggi (*salting-in*) dan selanjutnya mengendap (*salting-out*), sehingga garam tersebut harus dihilangkan. Proses menghilangkan garam dapat dilakukan dengan dialisis (Nooralabettu, 2014; Wingfield, 1998).

Pada produksi protein seperti enterosin, dialisis biasanya dilakukan menggunakan *celophane*. *Celophane* yang digunakan tergantung ukuran berat molekul protein target. Proses dialisis akan meningkatkan kemurnian protein, serta memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekulnya melalui membran semipermeabel.

Konsentrasi di dalam *celophane* juga akan lebih tinggi dibandingkan lingkungan luar *celophane*. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya difusi, yaitu molekul yang kecil seperti garam akan keluar dari *celophane* melalui pori-pori, sedangkan molekul yang besar akan terperangkap di dalam kantung *celophane*. Selain itu, perpidahan garam ammonium sulfat yang memiliki berat molekul rendah dari sampel berganti dengan larutan buffer dalam dialisat.

Protein yang terdapat dalam *celophane* selanjutnya dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE. Teknik ini akan memisahkan rantai polipeptida atau protein berdasarkan ukuran berat molekulnya. Protein seperti enterocin merupakan senyawa bermuatan listrik sehingga dapat bergerak dalam medan listrik. Langkah awal SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate- Poliacrimalide gel electrophorecys*) untuk produksi enterocin yaitu melalui denaturasi, dengan cara menambahkan β -merkaptotanol ke dalam sampel enterocin. Langkah selanjutnya yaitu dengan menambahkan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*). Penambahan senyawa ini menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Selain SDS, juga dengan gel poliakrilamid. Medium ini akan memisahkan protein menurut BM nya. Perpindahan protein melalui pori-pori gel dari kutub negatif (katoda) ke kutub positif (anoda). Protein yg BM nya lebih ringan akan bermigrasi lebih dahulu dan lebih cepat, sementara BM tinggi akan tertahan (Rachmania, dkk. 2017). Karakterisasi protein hasil SDS-PAGE dilakukan berdasarkan BM nya, yang dinyatakan dalam kilo Dalton (kDa) (Rachmania dkk., 2017).

BAB IV

PRODUKSI, KARAKTERISASI METABOLIT DAN DETEKSI GEN PENYANDI

Pada BAB ini, diuraikan langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan produksi metabolit dan bakteriosin BAL probiotik dari susu Kerbau Belang Toraja, meliputi optimasi, purifikasi, karakterisasi, dan deteksi gen penyandi enterocin. (Uraian ini diambil dari kegiatan yang telah dilakukan oleh penulis selama melakukan penelitian disertasi).

4.1 Optimasi Produksi Metabolit

Metabolit pH netral dari BAL diasumsikan sebagai bakteriosin. Bakteriosin adalah metabolit protein yang dihasilkan oleh golongan BAL, selain asam organik. Bakteriosin mudah didegradasi oleh enzim proteolitik. Laporan penelitian menyebutkan bahwa bakteriosin banyak digunakan sebagai antimikroba dan juga biopreservatif atau pengawet pangan, sehingga harus tahan terhadap berbagai suhu.

Produksi bakteriosin sangat dipengaruhi oleh pH awal medium pertumbuhan, sumber nutrisi, suhu, waktu pertumbuhan dan sifat genetik bakteri. Produksi Enterocin dinyatakan dalam arbitrary unit (AU) sesuai zona hambat pertumbuhannya terhadap patogen.

Umumnya, produksi enterocin dilakukan dengan menggunakan pH awal media MRS *broth* (6,7,dan 8) dan waktu inkubasi (sampling pada umur 7, 9, 11, 13, 15, 17, dan

19 jam). Masing-masing hasil sampling dari umur atau waktu inkubasi dan pH awal media diukur pH akhir dan diukur pula OD pada panjang gelombang 600 nm. Kultur selanjutnya disentrifugasi menggunakan suhu 4 °C, 10000 g selama 20 menit.

Supernatan dari hasil sentrifus selanjutnya disaring menggunakan membran *milipore* dengan diameter pori 0,22 µm dan pHnya dinetralkan menjadi 6-6,5 menggunakan NaOH. *Cell free supernatant* netral (CFSn) tersebut selanjutnya dievaluasi produksi bakteriosinnya secara kualitatif terhadap patogen uji yang dinyatakan dalam *arbitrary unit* (AU/mL). Pengujian aktivitas CFSn dilakukan dengan cara *disk diffusion methode* pada Cawan Petri yang berisi *soft NA* (0,8 %) dan patogen uji densitas 10⁶ sel/mL, menggunakan *blank disk* yang telah ditetesi 50 µL CFSn dengan melihat zona hambat yang terbentuk disekeliling disk. Produksi enterocin dihitung menggunakan rumus dari (Alang, 2019b; Eid et al., 2016; Reuben et al., 2020).

$$AU = Lz - Ls/V$$

Keterangan:

Lz = Luas zona hambat (mm)

Ls = Luas sumuran (mm)

V = Volume sampel (mL)

4.2 Karakterisasi *Cell free supernatant* netral

Karakterisasi CFSn dilakukan menurut (Angmo et al., 2016; Wang et al., 2021) dengan melihat toleransinya terhadap Proteinase K, suhu dan pH. Toleransi dilihat dengan zona bening yang terbentuk.

- a. Metabolit netral atau CFSn diuji toleransinya terhadap proteinase dengan cara ditambahkan dengan enzim proteinase atau Pro-K hingga konsentrasi akhir 1 mg/mL dan diinkubasi suhu 37 °C selama satu jam.
- b. Metabolit netral atau CFSn diuji toleransinya dengan cara dipanaskan pada suhu 60 °C selama 30 menit serta suhu 100 °C dan 121 °C selama 15 menit.
- c. Metabolit netral atau CFSn diuji toleransinya dengan cara mengatur supernatan pada pH 2, 3, 4, 8, 9, dan 10.

Masing masing uji toleransi (Pro-K, suhu dan pH) ditetesi sebanyak 50 uL diatas *Blank disk* dan diuji aktivitas antimikrobanya terhadap patogen menggunakan metode *disc diffusion agar*. Patogen uji yang digunakan yaitu densitas 10^6 sel/ mL sebanyak 100 uL, lalu disebar pada permukaan media *NA soft* (1,5 %) dalam Cawan Petri. Pengamatan diameter zona bening dilakukan dan dikur setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

4.3 Purifikasi Parsial Bakteriosin

Purifikasi parsial dilakukan menurut (Ankaiah et al., 2018; Wang et al., 2021) dengan cara menumbuhkan *E. faecalis* di medium *MRS broth* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya, kultur diambil sebanyak 10 mL (1 %, v/v) dan ditumbuhkan pada suhu optimum pertumbuhan yaitu medium *MRS broth* pH 8 selama 13 jam, kemudian disentrifus dengan kecepatan 10000 g pada suhu 4 °C selama 20 menit. Filtrat lalu dinetralkan menjadi 6,2 dan disaring menggunakan membran *milipore* diameter pori 0,22 µm.

Filtrat yang diperoleh lalu dipresipitasi menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ atau ammonium sulfat konsentrasi bervariasi

yaitu 40 %, 60 %, dan 80 % dan diinkubasi pada suhu 4 °C *overnight* menggunakan *stirrer*. Filtrat lalu disentrifus 10000 g pada suhu 4 °C selama 20 menit. Selanjutnya, presipitat lalu ditambahkan *buffer* fosfat pH 6,7 dengan perbandingan 1:1. Setelah itu, suspensi metabolit lalu didialisis menggunakan *membrane celophane* (kantong celofan) ukuran 5 kDa MWCO (*molecular weight cut off pori membrane*) dan *buffer* fosfat 0,2 M, pada suhu 4 °C *overnight* menggunakan *stirrer*. Konsentrasi protein suspensi tersebut selanjutnya diukur menggunakan uji *Braddfort* pada panjang gelombang 595 nm dan diuji aktivitas antimikrobanya terhadap patogen uji.

Protein hasil dialisis diasumsikan sebagai enterocin. Kondisi optimum produksi enterocin yang telah diperoleh nantinya digunakan untuk memproduksi enterocin untuk karakterisasi selanjutnya.

4.4 Karakterisasi Metabolit (enterocin)

Karakterisasi enterocin dilakukan dengan melihat aktivitas antimikroba enterocin setelah penambahan enzim proteolitik (Proteinase-K) dan pengukuran berat molekul (MB) enterocin menggunakan SDS-PAGE (Ankaiah et al., 2018; Ben Braïek et al., 2017; Dezwaan et al., 2007)

a. Uji Aktivitas Antimikroba Enterocin

Aktivitas antimikroba enterocin dilakukan menggunakan *disc diffusion* agar *methode*. Patogen uji densitas 10^6 sel/ mL diambil sebanyak 100 µL dan *dispreaad* pada Cawan Petri yang berisi NA *soft* (1,5 %). Kultur selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 4 °C.

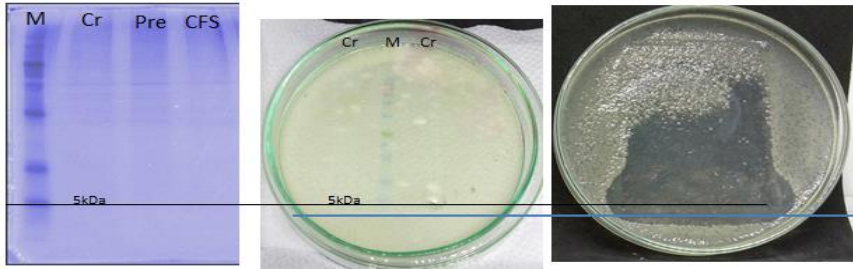
Enterocin ditambahkan dengan Proteinase-K, perbandingan 1 : 1 lalu diinkubasi satu jam, suhu 37 °C, kemudian diambil sebanyak 50 µL dan diteteskan diatas *blank disk*. Selanjutnya *blank disk* dikeringkan dan diletakkan diatas permukaan agar soft yang telah mengandung patogen uji. Selanjutnya diinkubasi *overnight* pada suhu 37 °C. Aktivitas antimikroba dilihat dengan mengukur diameter zona hambatnya.

b. Pengukuran Berat Molekul Enterocin

Berat molekul enterocin diukur dengan SDS-PAGE pada 4 % *stacking gel*, 16,5 % *separating gel* menggunakan marker dengan berat molekul 2,5 hingga 45 kDa (Ben Braïek et al., 2017; Dezwaan et al., 2007; Line et al., 2008). Penggunaan marker berukuran kecil dikarenakan enterocin menurut beberapa literatur merupakan polipeptida yang berukuran kecil, yaitu < 5 kDa.

Sebanyak 20% enterocin dari hasil produksi, dimix dengan 20 µL 2x *buffer*, lalu dipanaskan pada suhu 60 °C selama lima menit. Selanjutnya dilakukan elektroforesis pada tegangan konstan 30 V selama 45 menit. Setelah proses running, gel lalu dipotong menjadi dua. Satu bagian gel diwarnai dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dan satu bagian gel tidak diberikan pewarnaan atau CBB. Gel yang tidak diberi CBB lalu dicuci dengan akuades steril selama lima jam, dan aquadest yang digunakan diganti setiap jam untuk menghilangkan sisa SDS nya. Gel tersebut lalu diletakkan pada *plate* yang telah berisi *soft* agar (0,7 - 0,8 % w/v) padat dan patogen uji sebanyak 200 µL densitas 10⁶ sel/mL. Kultur lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 26 °C. Setelah inkubasi,

dilakukan pengamatan letak zona hambat disekitar gel, dan disejajarkan dengan pita protein gel yang diwarnai, seperti terlihat pada gambar 4.1.



Gambar 4. 1. Gel SDS-PAGE enterocin, marker 5 kDa (a) Gel SDS-PAGE terhadap patogen uji

4.5 Identifikasi Gen Penyandi Enterocin

Gen yang menyandi enterocin dapat terletak di kromosom atau plasmid. Amplifikasi DNA untuk memastikan keberadaan gen penyandi enterocin yang dihasilkan oleh isolat *E. faecalis* dapat dilakukan dengan menggunakan empat pasang primer spesifik menurut (Line et al., 2008; Ogaki et al., 2016; Saelim et al., 2012), yaitu *Ent A*, *Ent B*, *Ent P* dan *EntL50A/B*. Amplifikasi ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi enterocin yang dihasilkan isolat *E. faecalis*. Sekuen urutan pasangan primer terlihat pada Tabel 4.1.

Program PCR yang digunakan untuk primer *Ent A*, *Ent B*, *Ent P* yaitu denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50 - 62 °C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik, sedangkan untuk *EntL50A/B* program PCR yang digunakan yaitu denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi dilakukan pada suhu 95

°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 48 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik. Aplikon hasil PCR lalu di elektroforesis menggunakan agarosa 2 %, marker 100 bp dan *running* 90 Volt selama 1 jam. Aplikon kemudian di disekuensing dan dilanjutkan dengan BLASTX dan dibandingkan bersama sekuen nukleotida pada *data base genbank* NCBI.

Hasil PCR dari gen penyandi berkaitan erat dengan produksi enterocin oleh isolat *E.faecalis*. Suatu isolat *E.faecalis* akan mampu memproduksi enterocin meskipun hanya memiliki salah satu gen penyandi enterocin tersebut.

Tabel 4. 1. Pasangan Primer Gen Penyandi Enterocin

Primer	Sekuen primer (5'-3')	Amplikon (bp)
<i>Ent A</i>	F: 5'-GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA- 3' R: 5'-CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA- 3'	138
<i>Ent B</i>	F: 5'-CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG-3' R: 5'-AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC/TCCTGCAATATTCTCTTTAGC-3'	201
<i>Ent P</i>	F: 5'-GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT- 3' R: 5'-TCC TGC AAT ATT CTC TTT AGC- 3'	87
<i>EntL50</i>		
<i>A/B</i>	F: 5'-ATGGGAGCAATCGCAAAATTA-3' R: 5'-TTT GTT AAT TGC CCA TCC TTC/ CCTACTCCTAAGCCTATGGTA-3'	98

BAB V PENUTUP

Enterococcus faecalis adalah mikroba normal pada saluran cerna. Dikarenakan merupakan mikroba normal enterik, maka bakteri ini bersifat non patogen pada hospes. Meskipun *E.faecalis* selalu dikaitkan dengan bakterimia atau infeksi saluran kemih, namun kasus seperti ini hanya terjadi pada pasien yang mengalami *immune compromised* atau membawa *E.faecalis* yang telah resisten vancomycin. Dari hasil tulisan pada BAB dalam buku ini, dapat terlihat bahwa *E.faecalis* memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bakteri kandidat probiotik.

Berbagai macam peranan probiotik bagi bidang kesehatan yaitu meningkatkan sistem imun, melindungi dari kanker kolon, mencegah alergi, dan menurunkan kolesterol. Selain itu, probiotik juga banyak dimanfaatkan dalam dunia kosmetik, misalnya sebagai antiaging.

Selain sebagai probiotik, beberapa ahli juga berpendapat bahwa *E.faecalis* dapat digunakan dalam biopreservasi pangan karena menghasilkan enterocin yang berperan sebagai antimikroba pangan penyebab *food born disease*. Faktor pendukung untuk penerapan *E.faecalis* sebagai pengawet pangan yaitu karena kemampuannya dalam menghambat patogen terutama patogen saluran cerna dan penyebab *food born disease*, serta kestabilan enterocin pada kisaran panas dan range pH yang luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakr, M. A. S., & Al-Adiwish, W. M. (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Different Fruits with Proteolytic Activity. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 58–64. <https://doi.org/International Journal of Microbiology and Biotechnology>
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 316–325. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.01.041>
- Alang, H. (2019a). *Studi Potensi Dan Gen Penyandi Bakteriosin Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kerbau Belang (Bubalus Bubalis L.) Tana Toraja Sebagai Kandidat Probiotik (Doctoral dissertation, Universitas Brawijaya)* [Universitas Brawijaya]. <http://repository.ub.ac.id/id/eprint/189440/>
- Alang, H. (2019b). *STUDI POTENSI DAN GEN PENYANDI BAKTERIOSIN BAKTERI ASAM LAKTAT DARI SUSU KERBAU BELANG (Bubalus bubalis L.) TANA TORAJA SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK DISERTASI oleh HASRIA ALANG 157090100111006 PROGRAM DOKTOR BIOLOGI. Universitas Brawijaya.*
- Alang, H., Kusnadi, J., Ardiyati, T., & Suharjono. (2019). Identification of lactic acid bacteria as antimicrobial from milk Toraja Belang buffalo. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1), 012092. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012092>
- Alvarez-Cisneros, Y., & Espuñes, T. (2011). Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. *Formatex.Info*, November 2014, 1330–1341. <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1330-1341.pdf>

- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 428–435. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.10.057>
- Ankaiah, D., Palanichamy, E., Antonyraj, C. B., Ayyanna, R., Perumal, V., Ahamed, S. I. B., & Arul, V. (2018). Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 502–512. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.002>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
- Ben Braïek, O., Ghomrassi, H., Cremonesi, P., Morandi, S., Fleury, Y., Le Chevalier, P., Hani, K., Bel Hadj, O., & Ghrairi, T. (2017). Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(6), 771–786. <https://doi.org/10.1007/S10482-017-0847-1/METRICS>
- Berkiten, M., Okar, I., & Berkiten, R. (2000). In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, 26(4), 236–239. <https://doi.org/10.1097/00004770-200004000-00011>
- Borgogna, J. L. C., & Yeoman, C. J. (2017). The Application of Molecular Methods Towards an Understanding of the Role of the Vaginal Microbiome in Health and Disease.

Methods in Microbiology, 44, 37-91.
<https://doi.org/10.1016/BS.MIM.2017.08.003>

- Dezwaan, D. C., Mequio, M. J., Littell, J. S., Allen, J. P., Rossbach, S., & Pybus, V. (2007). Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 19(4), 241–250. <https://doi.org/10.1080/08910600701538240>
- Eid, R., Jakee, E., Rashidy, Asfour, Omara, Andil, Mahmood, Hahne, & AA2, and S. (2016). Potential Antimicrobial Activities of Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated from Raw Milk. *Journal of Probiotics & Health*, 04(02), 2–8. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000138>
- Fachrial, E., Harmileni, & Anggraini, S. (2022). Pengantar Teknik Laboratorium Mikrobiologi dan Pengenalan Bakteri Asam Laktat. In *PUBLISH BUKU UNPRI PRESS ISBN*. <http://jurnal.unprimdn.ac.id/index.php/ISBN/article/view/3172>
- Fitria, I. N., & Ardyati, T. (2014). Skrining Bakteri Asam Laktat asal Susu Kambing Peranakan Etawa sebagai Penghasil Bakteriosin. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 2(3), 164–168. <https://biotropika.ub.ac.id/index.php/biotropika/article/view/273>
- Forhad, M. H., Rahman, S. M. K., Rahman, M. S., Saikot, F. K., & Biswas, K. C. (2015). Probiotic Properties Analysis of Isolated Lactic Acid Bacteria from Buffalo Milk. *ARCHIVES OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 7(1), 1–5. https://www.researchgate.net/profile/Forhad-Saikot/publication/309040753_Probiotic_properties_analysis_of_isolated_lactic_acid_bacteria_from_buffalo_milk/links/57ff44bd08aeaf819a5ceccb/Probiotic-properties-analysis-of-isolated-lactic-acid-bacteria-from-bu

- Gede, D., Widyadnyana, A., Dewa, I., Sukrama, M., & Suardana, W. (2017). Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A dari Kolon Sapi Bali sebagai Probiotik melalui Analisis Gen 16S rRNA. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2). <https://doi.org/10.22146/JSV.17923>
- Hamed, E., & Elattar, A. (2013). Identification and some probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Egyptian camels milk. *Life Science Journal*, 10(1), 1952–1961. https://www.researchgate.net/profile/Eman-Zaghloul/publication/338330978_Identification_and_Some_Probiotic_Potential_of_Lactic_Acid_Bacteria_
- Hamzah, A. M., & Kadim, H. K. (2018). Isolation and identification of Enterococcus faecalis from cow milk samples and vaginal swab from human. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 218–222. <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue1/PartD/5-6-313-289.pdf>
- Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., Seal, B. S., Siragusa, G. R., & Stern, N. J. (2008). Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1094–1100. <https://doi.org/10.1128/AAC.01569-06/ASSET/5AE00514-CE61-43AD-B237-1BE86465C50B/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0030871740001.JPEG>
- Liu, W., Bao, Q., Jirimutu, Qing, M., Siriguleng, Chen, X., Sun, T., Li, M., Zhang, J., Yu, J., Bilige, M., Sun, T., & Zhang, H. (2012). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*, 167(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2011.05.001>

- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J. R., Faulks, R. M., & John Wickham, M. S. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiology*, 28(7), 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.06.007>
- Mohankumar, A., & Murugalatha, N. (2011). Characterization and Antibacterial Activity of Bacteriocin Producing Lactobacillus Isolated from Raw Cattle Milk Sample. *Intern. J. Biol*, 3(3), 128–143.
- Nooralabettu, K. P. (2014). Optimisation of ammonium sulfate precipitation method to achieve high throughput concentration of crude alkaline phosphatase from Brown shrimp (*Metapenaeus monoceros*) hepatopancreas. *Int J Anal Bio-Sci*, 2(1), 7–16. https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://e-jabs.umin.jp/2/2.7.pdf&hl=en&sa=T&oi=gsb-ggp&ct=res&cd=0&d=15992614917046154082&ei=CXtbZbnfEpqa6rQP1YWcsA4&scisig=AFWwaeYMOOTQGo1zH2vUYpYBO-X
- Ogaki, M. B., Rocha, K. R., Terra, M. R., Furlaneto, M. C., & Furlaneto-Maia, L. (2016). Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in Enterococcus Species. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(6), 1026–1034. <https://doi.org/10.4014/JMB.1509.09020>
- Oudhuis, G. J., Bergmans, D. C., Dormans, T., Zwaveling, J. H., Kessels, A., Prins, M. H., Stobberingh, E. E., & Verbon, A. (2011). Probiotics versus antibiotic decontamination of the digestive tract: Infection and mortality. *Intensive Care Medicine*, 37(1), 110–117. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2002-6>
- Perin, L. M., & Nero, L. A. (2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant Lactococcus lactis. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14->

- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Rubayet Ul Alam, A. S. M., & Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1223–1237. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17092>
- Rizqiyati, H., C., Sumantri, R. R., Noor, E., I., D. E., & Rianti. (2015). Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria From North Sumatra River Buffalo Milk. *JITV*, 20(2), 87–94.
- Saelim, K., Sohsomboon, N., Kaewsuwan, S., & Maneerat, S. (2012). Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci in vitro. *Czech Journal of Animal Science*, 57(11), 529–539. <https://doi.org/10.17221/6386-cjas>
- Shafakatullah, N., & Chandra, M. (2014). Screening of Raw Buffalo's Milk from Karnataka for Potential Probiotic Strains. *Research Journal of Recent Sciences Res.J.Recent Sci*, 3(9), 73–78. [Researchgate.net/profile/Shafakatullah-Nannu/publication/265251598_Screening_of_Raw_Buffalo's_Milk_from_Karnataka](https://www.researchgate.net/profile/Shafakatullah-Nannu/publication/265251598_Screening_of_Raw_Buffalo's_Milk_from_Karnataka)
- Sharaf, E. F., & Harbi, R. M. Al. (2011). Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Some Local Isolated of Lactic Acid Bacteria. *Res J. Microbiol*, 6(12), 826-838.
- Sharma, R. (2013). Characterization of Lactic Acid Bacteria from Raw Milk Samples of Cow, Goat, Sheep, Camel and Buffalo with Special Elucidation to Lactic Acid Production. *British Microbiology Research Journal*, 3(4), 743–752. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2013/4860>
- Silvetti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2014). Biopreservation potential of enterococcus faecalis isolated from Italian

- traditional raw milk cheeses. *CYTA - Journal of Food*, 12(3), 210–217.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2013.825327>
- Silvetti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2019). Does *Enterococcus faecalis* from Traditional Raw Milk Cheeses Serve as a Reservoir of Antibiotic Resistance and Pathogenic Traits? *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(5), abstrack.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2542>
- Sujaya, I. N., Ayu Nocianitri, K., & Ramona, Y. (2016). *Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Segar Sapi Bali*.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.155>
- Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *Scientific World Journal*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/4697445>
- Vanniyasingam, J., Kapilan, R., & Vasantharuba, S. (2019). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from cow milk and milk products Vanniyasingam, J 1 , Kapilan, R 2 and Vasantharuba, S 1 1. *Agrieast*, 13(1), 32–43.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.612285/BIBTEX>
- Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1), A.3F.1-A.3F.8.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS13>
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in

foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*,
5(MAY), 91530.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00241/BIBTEX>

BIODATA PENULIS



Hasria Alang

Dosen Program Studi Bioteknologi, Institut Teknolodi dan
Kesehatan Muhammadiyah Kalimantan Barat

Hasria Alang, lahir di Puundoho, 28 Maret 1985. Pendidikan S1 ditempuh pada Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin Makassar, lulus 2006. Menempuh S-2 di konsentrasi Mikrobiologi Program Studi Biomedik Universitas Hasanuddin Makassar dan lulus 2010. Kemudian pada tahun 2015, kembali melanjutkan pendidikan program doktor pada prodi Biologi Universitas Brawijaya Malang dan lulus tahun 2019. Tahun Februari 2011- Februari 2022 sebagai dosen tetap pada Jurusan Pendidikan Biologi P. MIPA STKIP Pembangunan Indonesia Makassar mata kuliah Mikrobiologi, Biologi Sel dan Biologi Molekuler. Saat ini, penulis kini tercatat sebagai dosen tetap pada prodi Bioteknologi, Institut Teknologi dan Kesehatan

58

Muhammadiyah (ITEKESMU) Kalbar. Semoga buku ini dapat memberikan manfaat bagi semua, dan semoga apa yang telah dan akan kita lakukan dapat bernilai ibadah dihadapan Allah SWT, Aamiin YRA.