



Isolasi dan Identifikasi Molekular Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikrobia dari Saluran Pencernaan Belut (*Monopterus albus*)

Ridwan¹, La Ode Kaharudin²

^{1,2}Pendidikan Biologi, Universitas Muslim Buton
Jln. Betoambari No.146 Kota Baubau, Sulawesi Tenggara
Email: ridwan071093@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.32938/jbe.v6i3.1277>

Abstrak

Isolasi bakteri asam laktat menggunakan sampel saluran pencernaan belut (*Monopterus albus*). Hasil isolasi diperoleh sebanyak tigabelas isolat, bakteri hasil isolasi selanjutnya dikarakterisasi secara fenotipik untuk memilih bakteri asam laktat. Hasil karakterisasi fenotipik diperoleh tujuh isolat yang sesuai dengan karakter bakteri asam laktat (ciri bakteri asam laktat bersifat gram positif dan katalase negatif). Tujuh isolat tersebut kemudian diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, dan *Vibrio harveyi*). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tujuh isolat bakteri asam laktat memiliki aktivitas antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan diameter zona hambat diantaranya isolat BA1 sebesar $23,33 \pm 1,15$ mm pada bakteri *Vibrio harveyi*, $11,67 \pm 0,58$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $16,67 \pm 0,58$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Isolat B1B memiliki diameter zona hambat sebesar $21,00 \pm 1,00$ mm pada *Vibrio harveyi*, $11,33 \pm 1,15$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan sebesar $14,67 \pm 1,15$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Isolat B1C memiliki diameter zona hambat sebesar $21,00 \pm 3,46$ mm pada *Vibrio harveyi*, $12,33 \pm 2,3$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $9,00 \pm 1,73$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Isolat B1D memiliki diameter zona hambat sebesar $25,33 \pm 2,89$ mm pada *Vibrio harveyi*, $12,33 \pm 2,52$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $13,00 \pm 2,65$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Isolat B1E memiliki diameter zona hambat sebesar $22,33 \pm 3,21$ mm pada *Vibrio harveyi*, $12,00 \pm 3,00$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $11,33 \pm 1,15$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Isolat B1F memiliki diameter zona hambat sebesar $21,00 \pm 1,73$ mm pada *Vibrio harveyi*, $11,33 \pm 1,15$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $11,67 \pm 2,08$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Serta isolat B1G memiliki diameter zona hambat $18,67 \pm 0,58$ mm pada *Vibrio harveyi*, $11,67 \pm 0,58$ mm pada *Aeromonas hydrophilad* dan $13,67 \pm 4,04$ mm pada *Staphylococcus aureus*. Penghambatan terhadap bakteri uji mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan antimikrobia. Tiga terbaik dari tujuh isolat bakteri diidentifikasi secara molekular menggunakan gen 16Sr RNA dengan primer 27F (5'-AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tiga isolat bakteri merupakan spesies *Lactococcus lactis*.

Kata Kunci: bakteri asam laktat, belut (*Monopterus albus*), antimikroba, gen 16s rRNA

Abstract

Isolation of lactic acid bacteria using eel digestive tract samples (*Monopterus albus*). The isolation results obtained as many as thirteen isolates, the isolate bacteria were then phenotypically characterized to select lactic acid bacteria. The results of phenotypic characterization obtained seven isolates that are in accordance with the character of lactic acid bacteria (the characteristic of lactic acid bacteria is gram positive and negative catalase). The seven isolates were then tested for their ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio harveyi*). The results

obtained showed that seven isolates of lactic acid bacteria had antimicrobial activity that was able to inhibit the growth of pathogenic bacteria with a zone of inhibition diameter including BA1 isolates of 23.33 ± 1.15 mm in *Vibrio harveyi* bacteria, 11.67 ± 0.58 mm in *Aeromonas hydrophila* and 16.67 ± 0.58 mm in *Staphylococcus aureus*. Isolate B1B had inhibition zone diameters of 21.00 ± 1.00 mm in *Vibrio harveyi*, 11.33 ± 1.15 mm in *Aeromonas hydrophila* and 14.67 ± 1.15 mm in *Staphylococcus aureus*. B1C isolates had inhibition zone diameters of 21.00 ± 3.46 mm in *Vibrio harveyi*, 12.33 ± 2.3 mm in *Aeromonas hydrophila* and 9.00 ± 1.73 mm in *Staphylococcus aureus*. B1D isolate had inhibition zone diameter of 25.33 ± 2.89 mm in *Vibrio harveyi*, 12.33 ± 2.52 mm in *Aeromonas hydrophila* and 13.00 ± 2.65 mm in *Staphylococcus aureus*. B1E isolate had inhibition zone diameters of 22.33 ± 3.21 mm in *Vibrio harveyi*, 12.00 ± 3.00 mm in *Aeromonas hydrophila* and 11.33 ± 1.15 mm in *Staphylococcus aureus*. B1F isolates had inhibition zone diameters of 21.00 ± 1.73 mm in *Vibrio harveyi*, 11.33 ± 1.15 mm in *Aeromonas hydrophila* and 11.67 ± 2.08 mm in *Staphylococcus aureus*. And isolate B1G had an inhibition zone diameter of 18.67 ± 0.58 mm in *Vibrio harveyi*, 11.67 ± 0.58 mm in *Aeromonas hydrophila* and 13.67 ± 4.04 mm in *Staphylococcus aureus*. The inhibition of the test bacteria indicated that the bacteria were capable of producing antimicrobials. The best three of the seven bacterial isolates were identified molecularly using the 16Sr RNA gene with primers 27F (5'-AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). The results obtained showed that the three bacterial isolates were *Lactococcus lactis* species.

Keywords: lactic acid bacteria, eel (*Monopterus albus*), antimicrobial, 16s rRNA gene

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri gram positif yang dikelompokkan berdasarkan karakteristik morfologi, metabolik, dan fisiologi tertentu (Wright and Axelsson, 2012). Bakteri asam laktat termasuk flora normal saluran pencernaan hewan sehat, seperti mamalia dan hewan akuakultur termasuk ikan (Nikoskelainen dkk. 2001). Strain bakteri asam laktat bermanfaat bagi kesehatan ikan yang dapat merangsang sistem kekebalan (Gatesoupe, 2007). Bakteri asam laktat memiliki aktivitas antimikroba karena produksi asam laktat, asam asetat, molekul bioaktif seperti etanol, asam format, asam lemak, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan reutericyclin. Banyak strain juga menghasilkan bakteriosin dan molekul mirip bakteriosin yang menunjukkan aktivitas bakteriosin (Aween dkk., 2012).

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri heterogeny yang berperan penting dalam berbagai proses fermentasi. Bakteri asam laktat memfermentasi karbohidrat makanan dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama fermentasi. Bakteri asam laktat dapat diaplikasikan sebagai kultur starter, dengan berbagai macam produk susu fermentasi (yaitu keju, yoghurt, susu fermentasi), daging, ikan, buah, sayuran dan sereal (Bintsis 2018). Bakteri Asam Laktat dapat dikembangkan sebagai probiotik yang menguntungkan bagi kesehatan inang, termasuk perlindungan terhadap patogen dan pengembangan sistem kekebalan tubuh. Probiotik didefinisikan sebagai tambahan mikroorganisme hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan inang dengan memodifikasi komunitas mikroorganisme inang (Verschuere dkk. 2000).

Peranan penting bakteri asam laktat bagi kesehatan inang mendorong para peneliti untuk mengisolasi dan menguji kemampuan bakteri tersebut dari berbagai sumber, misalnya usus ikan. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil antimikrobia dari saluran pencernaan belut (*Monopterus albus*).

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian meliputi: tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, kaca objek, pipet ukur dan gelas ukur, timbangan analitik, mikropipet, inkubator, autoklaf, rak tabung, vortex, sentrifuga, lemari pendingin, mortar, jarum ose, *tube*, spatula, bunsen dan kamera. Selanjutnya bahan yang digunakan diantaranya: usus belut, media MRSA (*De Mann Rogosa Shape Agar*), MRSB (*De Mann Rogosa Shape broth*), media Natrium Agar, akuades steril, kapas, kristal violet, iodin, etanol, safranin, spritus, alkohol, aluminium foil, tisu, serbuk agaros, TAE, *loading dye*, EtBr, *deionized water*, primer, *buffer*, enzim *lysozyme*, proteinase K, kloroform, CaCO₃, NaOH 0,1 N dan HCL 1 N.

Persiapan sampel

Belut diperoleh dari pasar Yogyakarta, dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi. Setelah itu, belut dibedah pada bagian perut secara aseptis dan diambil saluran pencernaan yang terdiri dari usus. Saluran pencernaan tersebut kemudian dihaluskan sampai halus menggunakan mortar.

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri asam laktat menggunakan metode *pour plate*. Tahapan dilakukan dengan menimbang sampel usus belut yang telah dihaluskan sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam 9 mL akuades steril lalu di homogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya akuades yang telah dimasukkan 1 g sampel diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi akuades 9 mL, sehingga diperoleh pengencer 10⁻². Prosedur yang sama dilakukan sampai pada pengencer 10⁻⁶. Pengencer 10⁻²-10⁻⁶ masing-masing diambil sebanyak 0,4 mL dan dimasukkan kedalam cawan petri. Cawan petri yang telah berisi sampel ditambahkan media MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar*). Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam (Bajpai dkk.. 2016).

Koloni yang tumbuh setelah inkubasi 24-48 jam dipilih untuk dimurnikan. Koloni yang dipilih hanya kelompok bakteri asam laktat. Bakteri Asam Laktat ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Mithun, et al. 2015). Pemurnian bakteri dilakukan dengan menggunakan metode *spread plate*. Isolat bakteri diambil menggunakan jarum ose steril kemudian digores pada permukaan media MRSA dalam cawan petri, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh selanjutnya diinokulasi pada media miring dalam tabung reaksi, setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu ruang. Isolat dalam media miring diperbanyak dan disimpan dalam lemari pendingin sebagai stok kultur.

Karakterisasi Fenotipik Bakteri Asam Laktat

Pengecatan Gram

Pengecatan gram bertujuan untuk memilih bakteri yang kemungkinan termasuk golongan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat termasuk kelompok bakteri gram positif. Pengecatan gram dilakukan dengan cara sediaan bakteri difiksasi di atas kaca objek dan diwarnai dengan Kristal violet (A) lalu didiamkan selama 1 menit. Kristal violet tersebut kemudian dibilas dengan akuades, setelah itu diwarnai dengan larutan iodin (B) dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian dibilas dengan etanol (C) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air dan diwarnai dengan safranin (D) selama 20 detik. Sediaan dicuci, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop (Radji, 2010).

Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk memilih bakteri yang kemungkinan termasuk golongan bakteri asam laktat. Umumnya bakteri asam laktat memiliki sifat katalase negatif. Uji katalase dilakukan dengan membuat preparat bakteri diatas permukaan kaca preparat. Setelah itu preparat ditetesi dengan 1-2 tetes hidrogen peroksida 30%, jika terbentuk gelembung udara pada preparat mengindikasikan bahwa bakteri termasuk katalase positif (Sari dkk., 2012).

Uji Aktivitas Antimikrobia Bakteri

Uji aktivitas antimikrobia bakteri asam laktat menggunakan tiga jenis bakteri uji diantaranya *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji merupakan bakteri patogen yang dipilih untuk menguji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat. Uji kemampuan bakteri asam laktat dilakukan dengan metode difusi agar, satu ose kultur bakteri uji (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus*) masing-masing diinokulasikan ke dalam media Nutrien Broth 20 mL, lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Selanjutnya masing-masing bakteri uji sebanyak 25 µL diinokulasikan ke dalam cawan petri lalu ditambahkan media media NA (*Nutrient Agar*). Setelah memadat, dibuat sumuran pada media NA dalam cawan petri sebesar 6mm. Sumuran pada media NA diinokulasikan sebanyak 20 µL media MRSB yang telah berisi kultur Bakteri Asam Laktat. Media NA tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran diukur sebagai aktivitas antimikroba Bakteri Asam laktat (Vasiee dkk., 2014). Bakteri yang memiliki aktivitas penghambatan paling baik diidentifikasi secara molekular.

Identifikasi Molekular Bakteri Asam Laktat

Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA genom dilakukan sesuai dengan protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Tahapan yang dilakukan yaitu menyiapkan kultur bakteri pada media MRSB yang berusia 48 jam. Kultur bakteri sebanyak 1,5 ml dipindahkan ke *tube mikrosentrifugasi*, kemudian disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 14-16,000 x g lalu supernatant dibuang. Sebanyak 200 µl gram (+) buffer dimasukkan ke *tube sentrifuge* dan ditambahkan *lysozyme* (4 mg/ml) kemudian divortex sampai *lysozyme* benar-benar larut. Larutan gram (+) buffer yang telah ditambahkan *lysozyme* dimasukkan ke dalam sampel kemudian *pellet* disuspensi ulang menggunakan *vortex* atau pipet. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, selama inkubasi dilakukan pembalikan beberapa kali. Selanjutnya 20 µl *proteinase K* ditambahkan dan divortex sampai homogen. Inkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, selama inkubasi setiap 3 menit dilakukan pembalikan (Geneaid 2017).

Tahapan selanjutnya sampel ditambahkan 200 µl GB *buffer* kemudian divortex, setelah itu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C. Sampel selanjutnya ditambahkan 200 µl *ethanol absolute* kemudian divortex selama 10 detik. Setelah dimasukkan kedalam GD *collum* dan disentrifuge dengan kecepatan 14-16.000 g selama 2 menit. *Collect tube* yang sebelumnya digunakan diganti dengan yang baru. Setelah itu ditambahkan 400 µl W1 *buffer* dan disentrifuge dengan kecepatan 14-16.000 g selama 30 detik. Kemudian 600 µl W1 *buffer* ditambahkan dan disentrifuge dengan kecepatan 14-16000 g selama 30 detik, selanjutnya GD *colomm* dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* steril dan ditambahkan 100 µl *pre-heated elution*. Sampel

kemudian *disentrifuge* dengan kecepatan 14-16000 g selama 3 menit. Supernatan yang masih berada dalam tebung *epENDORF* adalah ekstrak DNA.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan meneteskan sebanyak 1 μ L suspensi DNA ke atas *UV-Vis* nanodrop-spektrofotometer (*termo Scientific*), di ulang sebanyak 3 kali. Kemurnian DNA diukur pada panjang gelombang A260/A280. Sampel DNA dianggap baik berada pada kisaran nilai 1.8-2.0. Jika nilai kemurnian kurang dari kisaran tersebut maka konsentrasi protein bawaan cukup tinggi sedangkan jika nilai lebih besar maka konsentrasi DNA cukup tinggi (Syahputra, 2016).

Amplifikasi Gen *16S rRNA* Bakteri Asam Laktat

Reaksi amplifikasi dilakukan dalam tabung PCR, ampifikasi menggunakan *TaKara Eq Taq* sebanyak 0,25 μ l, 10 x *Ex Taq Buffer* (mengandung Mg^{2+} 2,5 mM) sebanyak 5 μ l, dNTP *mixture* (2,5 mM) sebanyak 4 μ l, primer 27f (5'-AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG-3') dan 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') masing-masing sebanyak 0,5 μ l, ekstrak genom sebanyak 1 μ g dan air destilasi ditambahkan sebanyak 10 μ l. Amplifikasi dilakukan sampai mendapatkan pita tunggal, proses amplifikasi diberi perlakuan: pra-denaturasi pada suhu 96°C selama 4 menit, diikuti 30 siklus pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 51,5°C selama 1,30 menit. Setelah itu ekstensi pada suhu 68°C selama 8 menit, PCR diselesaikan dengan elongasi selama 10 menit pada suhu 68°C. Produk PCR kemudian diambil dan disimpan pada suhu 4°C dan diperiksa menggunakan agarosa 1% (Lawalata dkk., 2015).

Elektroforesis Agarosa

Agarosa sebanyak 1,5% dipanaskan sampai mendidih dengan pelarut *buffer* TAE (*tris asetat*). Setelah itu didinginkan, lalu dituang pada *tray* elektroforesis dan ditunggu sampai memadat, kemudian sisiran diangkat. Selanjutnya, pada alat elektroforesis dituangkan *buffer* TAE 1x, *tray* yang berisi agarosa yang sudah memadat kemudian ditempatkan di alat elektroforesis sampai terendam oleh *buffer*. *Loading dye* disiapkan di atas parafilm kemudian dicampur produk PCR sebanyak 4 μ l dan dimasukkan ke dalam sumur agarosa menggunakan mikropipet, selain itu disiapkan marker 3 μ l. Alat elektroforesis dijalankan pada voltase 100 volt selama 30 menit. Agarosa hasil elektroforesis direndam pada larutan pewarna etidium bromida selama 10 menit. Selanjutnya divisualisasikan pada *transilluminator*. Adanya pita DNA dengan ukuran \pm 1500 bp menunjukkan bahwa gen *16S rRNA* telah teramplifikasi, hasil yang diperoleh di dokumentasikan menggunakan kamera.

Sekuensing Gen *16S rRNA*

Sekuensing gen *16S rRNA* hasil elektroforesis dilakukan dilakukan oleh PT Genetika Indonesia.

Analisis data

Analisis data meliputi analisis hasil pengujian aktivitas antimikroba dan analisis hasil sekuensing gen *16S rRNA*. Hasil pengujian aktivitas antimikroba dianalisis menggunakan SPSS 17.0 dengan metode analisis varian satu arah (*one way anova*). Analisis statistik menggunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Data hasil sekuensing gen *16S rRNA* dianalisis pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Program BLAST digunakan untuk menentukan similaritas sequen nukleotida sehingga dapat dilakukan identifikasi berdasarkan kesamaan sequen

nukleotida. Selanjutnya dilakukan Kontruksi *Phylogeny Tree* untuk menentukan tingkat kedekatan antar spesies menggunakan aplikasi MEGAX (Kumar dkk., 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Asam Laktat

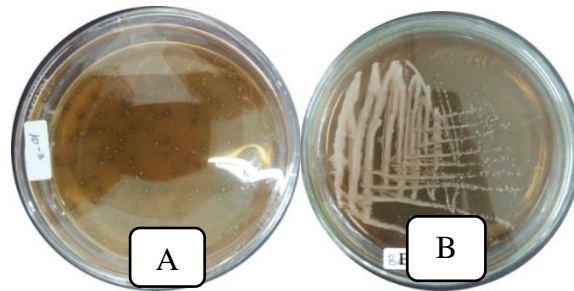
Isolasi bakteri asam laktat diperoleh sebanyak 13 isolat bakteri. Hasil isolasi seperti yang tercantum pada Gambar 1 kemudian dikarakterisasi secara fenotipik yang meliputi: bentuk sel, pengecatan gram dan uji katalase. Hasil karakterisasi fenotipik tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Fenotipik

Kode Isolat	Karakter							
	Sifat katalase	Bentuk sel	Sifat gram	Bentuk koloni	Elevasi	Margin	Tekstur	Warna
B1A	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cream</i>
B1B	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cream</i>
B1C	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1D	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1E	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	<i>Cream</i>
B1F	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1G	(-)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1H	(+)	<i>Coccus</i>	(-)	Sirkular	<i>Konveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1I	(+)	<i>Coccus</i>	(-)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1J	(+)	<i>Coccus</i>	(+)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1K	(+)	<i>Coccus</i>	(-)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1L	(+)	<i>Coccus</i>	(-)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu
B1M	(+)	<i>Coccus</i>	(-)	Sirkular	<i>Conveks</i>	<i>Entire</i>	Halus	Putih susu

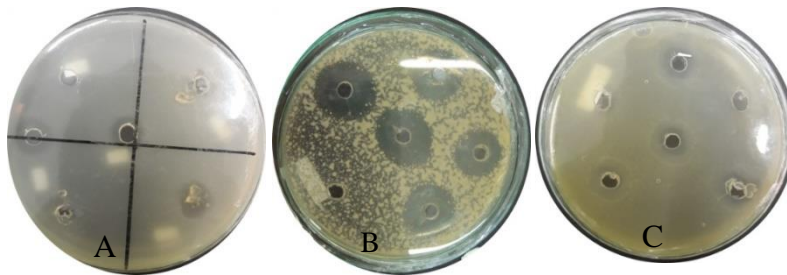
Keterangan: B1A s.d B1M : Isolat 1 s.d Isolat 13

Berdasarkan data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa 13 isolat bakteri hasil isolasi memiliki perbedaan pada sifat gram dan sifat katalase. Sifat katalase yang sesuai dengan karakter bakteri asam laktat dimiliki oleh 7 isolat bakteri. Ketujuh isolat tersebut diantaranya B1A, B1B, B1C, B1D, B1F, B1G. Sedangkan 6 isolat lainnya memiliki sifat katalase positif. Tujuh isolat bakteri yang identik dengan karakter bakteri asam laktat berdasarkan karakteristik fenotipik selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimikroba yang dihasilkan. Karakter yang membedakan Bakteri asam laktat dengan bakteri lain diantaranya sifat katalase negatif, bersifat gram positif dan menghasilkan zona hambat pada sekitar koloni (Nursyirwani dkk., 2017).



Gambar 1. A) Koloni Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi yang Membentuk Zona Bening, B) Koloni Bakteri Hasil *Streak*

Uji aktivitas antimikrobia bakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri patogen yang dipilih sebagai bakteri uji diantaranya, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* dan *Staphylococcus aureus*.



Gambar 2. Zona hambat bakteri asam laktat hasil screening terhadap : A) *Aeromonas hydrophila*; B) *Vibrio harveyi*; dan C) *Staphylococcus aureus*

Tabel 2. Uji Aktivitas Antimikrobia Bakteri Asam Laktat

No	Kode isolate	Ø Sumuran (mm)	Ø Rata-rata zona hambat (mm)		
			<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	B1A	5	23,33 ± 1,15 ^{ab}	11,67 ± 0,58 ^a	16,67 ± 0,58 ^a
2	B1B	5	21,00 ± 1,00 ^{cd}	11,33 ± 1,15 ^a	14,67 ± 1,15 ^{ab}
3	B1C	5	21,00 ± 3,46 ^{cd}	12,33 ± 2,31 ^a	9,00 ± 1,73 ^c
4	B1D	5	25,33 ± 2,89 ^a	12,33 ± 2,52 ^a	13,00 ± 2,65 ^b
5	B1E	5	22,33 ± 3,21 ^{bc}	12,00 ± 3,00 ^a	11,33 ± 1,15 ^{bc}
6	B1F	5	21,00 ± 1,73 ^{cb}	11,33 ± 1,15 ^a	11,67 ± 2,08 ^{bc}
7	B1G	5	18,67 ± 0,58 ^d	11,67 ± 0,58 ^a	13,67 ± 4,04 ^{ab}
8	K-	5	-	-	-

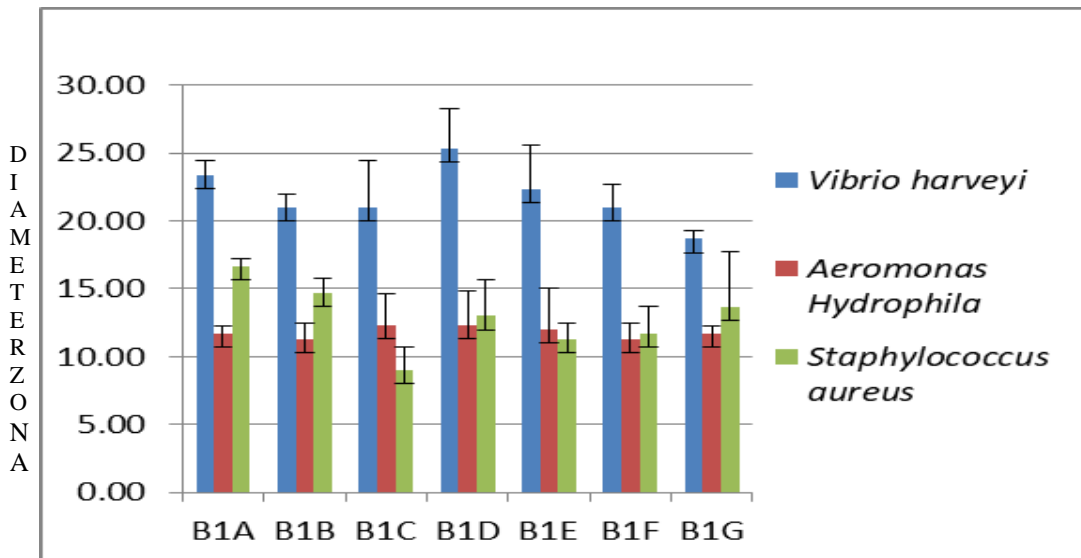
Keterangan : Ø = Diameter

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan tingkat perbedaan nyata – uji *Duncan* $\alpha < 0,05$ (rata-rata±std)

Berdasarkan data pada Tabel 2 diketahui bahwa 7 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan belut (*Monopterus albus*) memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*. Ringo (2005) menyatakan bahwa bakteri asam

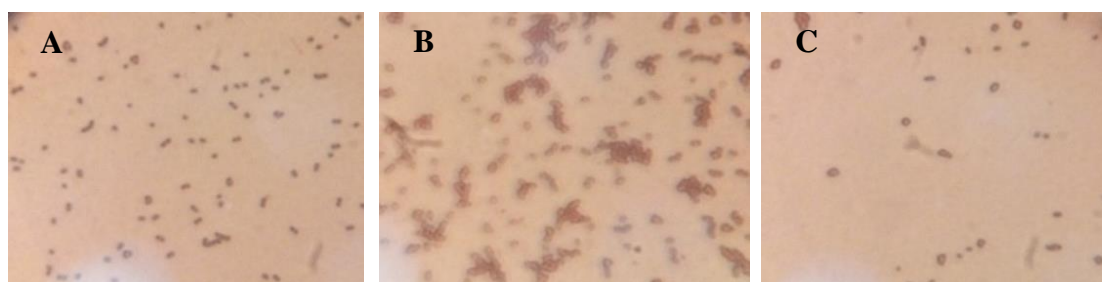
laktat yang diisolasi dari hewan akuatik memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyi*. (Buntin et.al 2008) melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil uji antimikroba yang diperoleh selanjutnya dibuat dalam bentuk diagram batang untuk mempermudah melihat perbandingan perbedaan aktivitas diantara isolat. Diagram batang hasil uji tujuh isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri uji (*Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio harveyi*) tercantum pada Gambar 3.



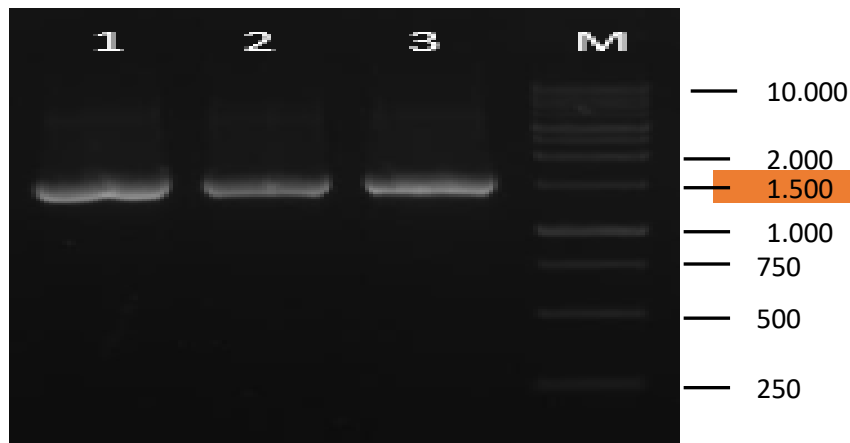
Gambar 3. Diagram Penghambatan Tujuh Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Saluran Pencernaan Belut (*Monopterus albus*)

Identifikasi molekular bakteri pada penelitian ini terdiri dari 3 isolat (B1A, B1D dan B1E). Bakteri tersebut merupakan bakteri yang memiliki kemampuan paling unggul dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri tersebut bersifat gram positif dan sel berbentuk *coccus*. Bentuk sel bakteri tercantum pada Gambar 4.



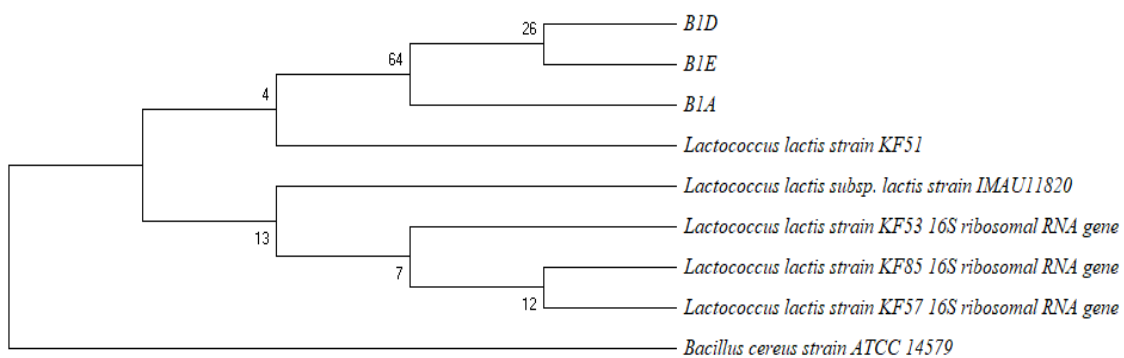
Gambar 4. Bentuk Sel Bakteri di Bawah Mikroskop A) B1A; B) B1D dan C) B1E (Perbesaran: 100X)

Identifikasi molekular bakteri menggunakan gen 16 SrRNA. Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 27F (5'-AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Hasil amplifikasi tercantum pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA disekuensing menggunakan primer yang sama dengan proses amplifikasi yaitu primer 27F dan 1492R. Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). BLAST adalah salah satu alat analisis sekuens gen yang tersedia di domain publik pada link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Mcginnis and Madden 2004). Sekuen gen yang diperoleh pada penelitian dicocokkan dengan database gen 16S rRNA *ribosomal* pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Hasil analisis menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki tingkat kemiripan 99% dengan spesies *Lactococcus lactis*. Selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik untuk menentukan hubungan evolusi antara spesies bakteri hasil isolasi dan hasil BLAST. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *software* MEGAX. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik tercantum pada Gambar 6.



Gambar 6. Pohon Filogeni Isolat Bakteri Asam Laktat dari Belut (*Monopterus albus*) (Bootstrap = 1000)

Berdasarkan pohon filogeni yang tercantum pada Gambar 3. Menunjukkan bahwa isolat B1A, B1D dan B1E yang diisolasi dari saluran pencernaan belut berada pada satu *cluster* dengan *Lactococcus lactis*. Hasil yang diperoleh tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan belut (*Monopterus albus*) merupakan spesies *Lactococcus lactis* berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA. *Lactococcus lactis* merupakan salah satu bakteri asam laktat yang terdapat di dalam saluran pencernaan ikan. Menurut penelitian (Merrifield &

Ringo 2014) bakteri asam laktat termasuk bakteri indigenous saluran pencernaan ikan. Bakteri asam laktat yang menempati saluran pencernaan ikan termasuk diantaranya *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* spp., *Weissella cibaria*, dan *Lactobacillus* spp. Penelitian Kato et al. (2016) melaporkan bahwa *Lactococcus* spp. merupakan spesies bakteri asam laktat yang paling dominan menempati saluran pencernaan ikan pebbly (*Alestes baremoze*). Hasil penelitian tersebut juga melaporkan bahwa *Lactococcus* spp. dari saluran pencernaan ikan pebbly (*Alestes baremoze*) memiliki aktivitas antimikroba dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (zona hambat 6±0,17), *Echericia coli* (zona hambat 7±0,10) dan *Proteus* spp. (3,5±0,10).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri dari saluran pencernaan belut mampu menghasilkan antimikroba, ditunjukkan dengan adanya zona hambat setelah uji penghambat terhadap bakteri patogen. Bakteri asam laktat dari saluran pencernaan belut termasuk dalam spesies *Lactococcus lactis*.

Saran

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan belut menghasilkan antimikroba, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait kemampuan daya hambat antimikroba yang dihasilkan.

DAFTAR RUJUKAN

- Aween, Mohamed Mustafa, Zaiton Hassan, Belal J Muhialdin, Hanina Mohd Noor, Yossra A Eljamel, Negeri Sembilan, and U P M Serdang. 2012. "Evaluation on Antibacterial Activity of Lactobacillus Acidophilus Strains Isolated from Honey Department of Microbiology , Faculty of Science and Technology , Universiti Sains Islam Malaysia (USIM) Bandar Baru Nilai , Faculty of Science , University Put." *American Journal of Applied Sciences* 9 (6): 807–17.
- Bajpai, Vivek K., Jeong Ho Han, Gyeong Jun Nam, Rajib Majumder, Chanseo Park, Jeongheui Lim, Woon Kee Paek, Irfan A. Rather, and Yong Ha Park. 2016. "Characterization and Pharmacological Potential of Lactobacillus Sakei 111 Isolated from Fresh Water Fish Zacco Koreanus." *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* 24 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40199-016-0147-8>.
- Bintsis, T. 2018. "Lactic Acid Bacteria: Their Applications in Foods." *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access* 6 (2): 89–94. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>.
- Buntin, Nirunya, Suphitchaya Chanthachum, and Tipparat Hongpattarakere. 2008. "Screening of Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tracts of Marine Fish for Their Potential Use as Probiotics." Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.
- Gatesoupe, François Joël. 2007. "Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in

Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments.” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14 (1–3): 107–14. <https://doi.org/10.1159/000106089>.

Geneaid. 2017. “Presto™ Mini GDNA Bacteria Kit.” *Geneaid* 004: 1–8.

Kato, Charles, Mark Mugaanyi, Samuel Majalija, Andrew Tamale, Nathan Musisi, and Asuman Sengooba. 2016. “Isolation and Identification of Potential Probiotics Bacteria from the Gut of Oreochromis Niloticus and Clarias Gariepinus in Uganda.” *British Microbiology Research Journal* 17 (5): 1–8. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/29721>.

Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura. 2018. “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.” *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547–49. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Lawalata, Helen Joan, Langkah Sembiring, and Endang Sutriswati Rahayu. 2015. “Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Agents from Bakasang, An Indonesian Traditional Fermented Fish Product.” *Indonesian Journal of Biotechnology* 16 (2): 93. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.16368>.

Mcginnis, Scott, and Thomas L Madden. 2004. “BLAST : At the Core of a Powerful and Diverse Set of Sequence Analysis Tools” 32: 20–25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>.

Merrifield, Daniel L., and Einar Ringø. 2014. “Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics.” *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 1–465. <https://doi.org/10.1002/9781118897263>.

Mithun, Sarangdhar, Vora Dipak, and Sarang Sheela. 2015. “Screening and Characterization of Novel Bacteriocin Producing Lactobacilli Obtained From Raw Milk Samples.” *World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor Research Article ISSN 4045* (4): 2277–7105.

Nikoskelainen, Sami, Seppo Salminen, Göran Bylund, and Arthur C. Ouwehand. 2001. “Characterization of the Properties of Human- and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish.” *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6): 2430–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2430-2435.2001>.

Nursyirwani, Nursyirwani, Widya Asmara, Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni, Triyanto Triyanto, Muhammad Fauzi, and Zainal Abidin Muchlisin. 2017. “Phenotype and Genotype of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolated from the Tiger Grouper Epinephelus Fuscoguttatus Alimentary Tract.” *F1000Research* 6 (0): 1–14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12734.1>.

Sari, Rohmah Anita, Risa Nofiani, Puji Ardiningsih. 2012. “KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT GENUS Leuconostoc DARI PEKASAM ALE-ALE

HASIL FORMULASI SKALA LABORATORIUM.” *Jurnal Kimia* 1 (1 ISSN 2302-1077): 14–20.

Syahputra, A. 2016. “Evaluasi Metode Isolasi Asam Nukleat Dalam Deteksi PCR Untuk Patogen Antraknosa, Bulai, Huanglongbing Dan Mosaik,” 1–59.

Vasiee, A. R., F. Tabatabaei Yazdi, A. Mortazavi, and M. R. Edalatian. 2014. “Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Lactobacilli Spp. from Tarkhineh.” *International Food Research Journal* 21 (6): 2487–92. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.C1.019>.

Verschuere, Laurent, Geert Rombaut, Patrick Sorgeloos, and Willy Verstraete. 2000. “Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4): 655–71. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.4.655-671.2000>.