

RD  
 RKH  
 RPP

# **LAPORAN AKHIR**

## **PENELITIAN DOSEN MAHASISWA**

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
*CELL FREE SUPERNATANT* ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PADA  
PRODUK SUSU FERMENTASI DI MALANG



### **IDENTITAS PENGUSUL**

Ketua : ALIF FIRMAN FIRDAUSY (19920607 201903 1 017)

Anggota : (1) ZIYANA WALIDAH (19941029 20191120 2 262)

(2) NOFITA DIYAH NINGRUM (18930072)

(3) KURNIA MUFIDAH (18930102)

**UNIT PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN**  
**UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**TAHUN 2021**

**LAPORAN AKHIR**  
**PENELITIAN DOSEN MAHASISWA**

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
*CELL FREE SUPERNATANT* ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PADA  
PRODUK SUSU FERMENTASI DI MALANG



**IDENTITAS PENGUSUL**

Ketua : ALIF FIRMAN FIRDAUSY (199206072019031017)  
Anggota : (4) ZIYANA WALIDAH (19941029 20191120 2 262)  
(5) NOFITA DIYAH NINGRUM (18930072)  
(6) KURNIA MUFIDAH (18930102)

**UNIT PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN**  
**UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**TAHUN 2021**

## HALAMAN PENGESAHAN

Laporan penelitian berjudul “Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antibakteri *Cell Free Supernatant* Isolat Bakteri Asam Laktat Pada Produk Susu Fermentasi Di Malang” ini disetujui oleh Ketua Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) dan atas sepengetahuan Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 8 Desember 2021

Ketua : Alif Firman Firdausy  
NIP. 19920607 201903 1 017

Tanda Tangan \_\_\_\_\_

Anggota 1 : Ziyana Walidah  
NIP. 19941029 20191120 2 262

Tanda Tangan \_\_\_\_\_

Anggota 2 : Nofita Diyah Ningrum  
NIM. 18930072

Tanda Tangan \_\_\_\_\_

Anggota 3 : Kurnia Mufidah  
NIM. 18930102

Tanda Tangan \_\_\_\_\_

Mengetahui/menyetujui

Dekan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim  
Malang

Ketua UPPM FKIK UIN Maulana Malik  
Ibrahim Malang

**Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati P.W., M. Kes., Sp.**

**Rad (K)**

NIP. 19681031 1996 012001

**Dr. Begum Fauziah, S.Si., M. Farm**

NIP. 19830628 2009 122004

## **PERNYATAAN ORISINALITAS**

Kami yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : ALIF FIRMAN FIRDAUSY  
NIP : 19920607 201903 1 017  
Pangkat/Gol. : Penata Muda Tk. I, III/b  
Bidang Keahlian : Biomedik dan Farmasi Klinis  
Fakultas/Jurusan : FKIK/ Farmasi  
Jabatan dalam Program : Ketua Pengusul

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam karya ilmiah ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana program yang telah kami terima dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 8 Desember 2021

Ketua Pengusul

Apt. Alif Firman Firdausy, S.Farm., M.Biomed.  
NIP. 19920607 201903 1 017

# DAFTAR ISI

LAPORAN AKHIR .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
BAB I.....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II.....	4
A. Produk Susu Fermentasi .....	4
B. Bakteri Asam Laktat (BAL) .....	5
C. Aktivitas Antibakteri BAL .....	7
D. Metabolit Profiling Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry .....	8
BAB III .....	11
A. Desain Penelitian .....	11
B. Waktu dan Tempat .....	11
C. Alat dan Bahan .....	12
D. Prosedur Penelitian.....	13
BAB IV .....	15
A. Hasil Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) .....	15
B. Aktivitas Antibakteri Isolat BAL terhadap <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i> .....	19
BAB V.....	25
A. Kesimpulan.....	25
B. Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA .....	26

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Produk susu fermentasi telah dikenal khasiatnya secara luas, khususnya dalam memelihara kesehatan tubuh. Beberapa produk susu fermentasi di antaranya adalah yoghurt dan kefir. Yoghurt merupakan produk fermentasi dengan menggunakan bahan utama berupa susu hewani serta starter bakteri penghasil asam laktat yang diinkubasikan dalam rentang waktu tertentu (Raras *et al.*, 2019). Sebagaimana yoghurt, kefir juga merupakan produk fermentasi dari menggunakan kultur bakteri penghasil asam laktat. Yang membedakan kefir dari yoghurt adalah selain bakteri, dalam starter kefir juga terdapat ragi/khamir (Setyowati and Setyani, 2009). Aktivitas mikroorganisme yang terkandung dalam produk susu fermentasi menghasilkan metabolit yang berguna bagi tubuh, salah satunya adalah untuk melawan bakteri-bakteri patogen yang masuk untuk menginfeksi tubuh manusia. Senyawa-senyawa metabolit dalam susu fermentasi yang berperan sebagai antibakteri patogen di antaranya seperti: bakteriosin, asam laktat, karbon dioksida, asam asetat, hidrogen peroksida dan senyawa diasetil (Shokri *et al.*, 2018).

Terdapat berbagai macam bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam produk fermentasi susu. Beberapa spesies di antaranya adalah *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* dan bakteri-bakteri lainnya yang didominasi oleh genus *Lactobacillus* (Liu *et al.*, 2014). Jenis maupun komposisi BAL yang terkandung dalam produk fermentasi susu sangat bervariasi tergantung dari sejumlah faktor, seperti asal *grain* (bibit) bakteri dan kondisi pembuatan produk fermentasi itu sendiri (Plessas *et al.*, 2017). Oleh karena itu, produk fermentasi susu di setiap daerah memiliki karakteristik serta kandungan BAL yang berbeda-beda.

Daerah Malang meliputi Kota Malang, Kabupaten Malang dan Kota Batu menjadi salah satu daerah penghasil susu sapi terbaik di Indonesia. Sejalan dengan itu, banyak pula produk hasil olahan susu sapi yang diproduksi di daerah Malang, termasuk yoghurt dan kefir. Penelitian yang telah dilakukan oleh Raras *et al.* (2019) berhasil mengidentifikasi *Lactobacillus helveticus* sebagai salah satu BAL yang dominan terdapat pada produk kefir susu kambing yang diperoleh dari daerah Malang. Dalam publikasi tersebut dibuktikan pula bahwa *L. helveticus* memiliki kemampuan penghambatan pembentukan biofilm *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* (ESBL) *Klebsiella pneumoniae* sekaligus aktivitas antimikroba terhadap bakteri tersebut. Diduga sejumlah senyawa bioaktif berperan penting dalam aktivitas antimikroba tersebut.

Dalam rangka mengidentifikasi senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh BAL, perlu dilakukan suatu kajian metabolomik yang komprehensif. Pendekatan metabolomik mencakup penentuan secara simultan dan menyeluruh terhadap metabolit pada waktu dan kondisi tertentu (Irwan and Junaidi, 2020). Salah satu metode dengan pendekatan metabolomik yang banyak digunakan untuk menganalisis *metabolome* bakteri salah satunya adalah *metabolite profiling* (Wolfender *et al.*, 2015). *Metabolite profiling* memberikan informasi fungsional secara langsung pada fenotipe metabolik dan informasi tidak langsung pada berbagai fenotipe yang ditentukan oleh molekul kecil (Lisec *et al.*, 2006). Selain itu metode *metabolite profiling* dapat digunakan untuk menghimpun informasi tentang *metabolic pathway* dari suatu mekanisme fisiologis bakteri, termasuk mekanisme antimikroba yang dimiliki oleh BAL dalam menghambat pertumbuhan dan membunuh mikroorganisme patogen (Fuochi *et al.*, 2019).

Penelitian ini dilakukan untuk mengkarakterisasi BAL yang terkandung dalam produk susu fermentasi di Malang secara fenotipik melalui kajian sifat morfologi, fisiologi dan biokimia bakteri. BAL yang berhasil diisolasi dari produk susu fermentasi tersebut kemudian akan diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen baik Gram positif (*Staphylococcus aureus*) maupun Gram negatif (*Escherichia coli*). Isolat BAL dengan kemampuan hambat terbaik

akan diekstraksi CFS-nya untuk dilakukan *metabolite profiling* menggunakan instrumen *gas chromatography-mass spectrophotometry* (GC-MS).

#### **B. Rumusan Masalah**

1. Bagaimanakah karakteristik bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam produk susu fermentasi di Malang?
2. Bagaimanakah aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang terhadap *Escherichia coli*?
3. Bagaimanakah aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang terhadap *Staphylococcus aureus*?

#### **C. Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui karakteristik bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam produk susu fermentasi di Malang.
2. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang terhadap *Escherichia coli*.
3. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang terhadap *Staphylococcus aureus*.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Produk Susu Fermentasi**

##### **1. Yoghurt**

Yoghurt adalah produk fermentasi susu dengan bantuan bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dengan dan atau tanpa tambahan bahan pangan lain. Asam laktat yang dihasilkan oleh BAL dalam susu fermentasi inilah yang menciptakan citarasa asam dalam produk yoghurt. BAL yang terkandung dalam yoghurt memproduksi asam laktat dari proses metabolisme laktosa susu sehingga produk yang dihasilkan yakni berupa susu yang terkoagulasi dengan cita rasa yang khas akibat peningkatan keasamaan media (Harjiyanti, Pramono and Mulyani, 2013).

Umumnya yoghurt memiliki tekstur yang sedikit kental hingga kental akibat dari koagulasi protein susu oleh senyawa-senyawa asam organik yang dihasilkan BAL. Bahan yang digunakan dalam produksi yoghurt di antaranya adalah: susu, *yoghurt grain* (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, dan lainnya) serta perasa apabila suka. Yoghurt yang baik memiliki kadar keasamaan antara 0,5% sampai dengan 2% serta mengandung kultur BAL minimum  $10^7$  CFU/ml (Badan Standardisasi Nasional, 2019).

##### **2. Kefir**

Kefir merupakan produk fermentasi susu yang terbuat dari *starter culture* spesifik berupa *grain* kefir. *Grain* kefir itu sendiri mengandung beberapa macam bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* dan *Acetobacter*. Selain itu *grain* kefir juga mengandung khamir baik yang dapat memfermentasi laktosa, seperti *Kluyveromyces marxianus* maupun yang tidak dapat memfermentasi laktosa, seperti *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces exiguous* (Pothuraju *et al.*, 2017). *Grain* kefir yang mengandung kultur sejumlah bakteri tersebut selanjutnya dicampurkan ke dalam

berbagai macam produk susu seperti; susu sapi, kambing, domba, santan kelapa, sari beras, kedelai, dan lain-lain, namun yang paling umum digunakan adalah produk susu sapi dan susu kambing (Ot'es and Cagindi, 2003). Produk utama fermentasi susu oleh bakteri-bakteri yang terkandung dalam *grain* kefir adalah senyawa-senyawa seperti asam laktat, asam asetat, CO<sub>2</sub>, alkohol, dan beberapa senyawa aromatik (Machado *et al.*, 2013).

*Grain* kefir bersifat tidak larut dalam air dan biasanya terletak mengendap di dasar produk kefir. Besarnya *Grain* kefir bervariasi dengan diameter antara 0,3-3,5 cm yang komposisinya terdiri dari: air (89-90%b/b), lipid (0,2%b/b), protein (3,0%b/b), gula (6,0%b/b), dan abu (0,7%b/b) (Plessas *et al.*, 2017). Produk fermentasi dari susu dengan *grain* kefir diketahui kaya akan khasiat bagi kesehatan, baik untuk pencegahan maupun pengobatan suatu penyakit. Setyowati dan Setyani (2009) menyebutkan bahwa dengan mengonsumsi kefir dapat membantu meningkatkan imunitas saluran cerna, berkhasiat sebagai antimikroorganisme, antikanker, membantu menurunkan kadar kolesterol, antidiabetes, membantu menurunkan tekanan darah pada kasus hipertensi, bersifat antioksidan, membantu penyembuhan luka, serta membantu mengatasi permasalahan kesehatan pada penderita intoleran laktosa. Manfaat-manfaat tersebut tidak terlepas dari nutrisi yang terkandung dalam kefir itu sendiri yakni antara lain: karbohidrat, asam amino, protein, mineral, fosfor, kalsium, dan vitamin. Kefir merupakan sumber probiotik yang sangat baik untuk memelihara kesehatan tubuh. Probiotik itu sendiri adalah mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dapat bermanfaat meningkatkan kesehatan tubuh *host/inangnya* (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006).

## **B. Bakteri Asam Laktat (BAL)**

BAL adalah bakteri utama yang bertanggungjawab dalam konversi laktosa dalam susu menjadi asam laktat. Konversi tersebut ditandai dengan adanya penurunan pH media (susu) dan peningkatan keasaman produk susu fermentasi (Machado *et al.*, 2013).

Berdasarkan taksonominya BAL termasuk ke dalam golongan bakteri Gram positif penghasil asam laktat sebagai hasil dari fermentasi karbohidrat, tidak

menghasilkan enzim katalase, mikroaerotoleran, serta asidotoleran. Selain itu karakteristik BAL lainnya adalah bersifat *non-motil*, tidak memproduksi endospora, berbentuk batang atau terkadang juga berbentuk *coccus*, serta bersifat anaerob fakultatif (Ekundayo, 2014). Terdapat sekitar 20 genus bakteri yang termasuk dalam BAL, di antaranya sering dimanfaatkan dalam industri pengolahan pangan yakni: *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Liu *et al.*, 2014).

### **1. Identifikasi BAL**

Bakteri asam laktat (BAL) dapat diidentifikasi secara genotip maupun fenotip. Identifikasi BAL secara genotip didasarkan pada pengamatan karakteristik molekuler khususnya urutan kode genetik bakteri tersebut. Sedangkan identifikasi secara fenotip dilakukan melalui pengamatan morfologi, fisiologi dan biokimia bakteri (Bağder Elmacı *et al.*, 2015).

Pengamatan morfologi BAL dilakukan secara mikroskopis dengan metode pengecatan Gram. BAL tergolong dalam bakteri Gram positif sehingga akan berwarna ungu di bawah mikroskop. Selain itu, melalui studi morfologi juga dapat digunakan untuk mengetahui bentuk dari bakteri. Dalam hal ini BAL sebagian besar berbentuk batang (*bacil*) dan sebagian kecil berbentuk *coccus*. Identifikasi fisiologis dan biokimia BAL berguna dalam mengetahui respon bakteri terhadap perubahan kondisi lingkungan yang ada di sekitarnya. Identifikasi fisiologi dan biokimia BAL meliputi uji motilitas, uji pembentukan endospora, uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, dan uji oksidase (Detha *et al.*, 2020). Karakteristik BAL berdasarkan identifikasi fisiologis dan biokimia adalah bakteri non-motil, tidak membentuk endospora, oksidase negatif dan katalase negatif (Ekundayo, 2014).

### **2. Senyawa Bioaktif BAL**

Berdasarkan produk hasil fermentasinya, BAL dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok besar yakni BAL homofermentatif dan heterofermentatif. (1) BAL homofermentatif melakukan proses fermentasi glukosa pada media terfermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. BAL homofermentatif dapat memproduksi enzim fruktosa difosfat aldolase, salah satu

enzim yang berperan dalam jalur metabolisme glikolisis. Metabolisme BAL homofermentatif melibatkan enzim aldolase dan heksosa aldolase namun tidak mempunyai enzim fosfoketolase sehingga sangat sedikit atau bahkan sama sekali tidak dapat menghasilkan CO<sub>2</sub>. Beberapa contoh BAL yang termasuk ke dalam jenis homofermentatif adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan beberapa spesies *Lactobacillus*. (2) BAL heterofermentatif dapat menghasilkan produk fermentasi berupa asam laktat sekaligus senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO<sub>2</sub>. Tidak seperti BAL homofermentatif, BAL heterofermentatif tidak mampu memproduksi enzim fruktosa difosfat aldolase melainkan dapat menghasilkan enzim glukosa-6-fosfat dehidrogenase dan 6-fosfat-glukonat dehidrogenase sehingga mempunyai jalur pembentukan asam laktat yang berbeda dengan BAL homofermentatif. Selain itu, pada BAL heterofermentatif terdapat enzim fosfoketolase yang dapat menghasilkan CO<sub>2</sub>. Metabolisme BAL heterofermentatif menggunakan heksosa (karbohidrat 6 atom C) melalui jalur heksosa monofosfat. BAL yang termasuk ke dalam heterofermentatif adalah *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus* (Keles and Demirci, 2011).

### C. Aktivitas Antibakteri BAL

BAL telah terbukti memiliki manfaat yang sangat besar bagi kesehatan, salah satunya adalah aktivitas antibakteri patogen. Kemampuan antibakteri yang dimiliki oleh BAL banyak dimanfaatkan manusia tidak hanya untuk dikonsumsi melainkan juga sebagai preservatif alami. Kemampuan BAL tersebut disebabkan oleh kemampuannya dalam memproduksi senyawa-senyawa yang bersifat antimikroba seperti: asam-asam organik, etanol, diacetyl, hydrogen peroksida dan bakteriosin (Tabel 2.1).

Sejumlah isolat BAL yang berasal dari berbagai macam lingkungan terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri patogen, di antaranya seperti: *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*-ESBL, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, dan *Acinetobacter baumannii* (Wimmerstedt and Kahlmeter, 2008). BAL menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui sejumlah mekanisme yakni: (1) Produksi asam laktat dan penurunan pH lingkungan, (2)

produksi bakteriosin dan senyawa-senyawa antimikrobal lainnya, (3) membentuk lapisan biofilm yang menghambat kolonisasi bakteri patogen (Kasra-Kermanshahi and Mobarak-Qamsari, 2015).

**Tabel 2.1.** Senyawa bioaktif BAL yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Kasra-Kermanshahi and Mobarak-Qamsari, 2015)

No.	Senyawa	Mekanisme aksi
1.	Asam laktat	Menghambat metabolisme seluler bakteri patogen
2.	Hidrogen peroksida	Inaktivasi sejumlah biomolekul bakteri melalui reaksi berantai anion superoksida Aktivasi sistem laktoperoksidase
3.	Karbon dioksida	Menciptakan lingkungan yang bersifat anaerobic Penghambatan enzim dekarboksilase Merusak membrane sel bakteri patogen
4.	Diacetyl	Gangguan pada penggunaan arginin
5.	Bakteriosin	Perusakan struktur membrane sitoplasmik bakteri patogenik

#### D. Metabolit Profiling Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry

##### 1. Konsep *Metabolite Profiling*

Metabolit adalah senyawa biologis yang dihasilkan dari proses metabolisme yang dilakukan oleh makhluk hidup. Pada dasarnya setiap makhluk hidup melakukan metabolisme sebagai salah satu upaya dalam menjalankan setiap fungsi kehidupannya. Metabolit berperan penting dalam menghubungkan berbagai *pathway* yang terjadi dalam sel. Beragam *pathway* seperti regulasi transkripsi dan translasi, regulasi interaksi antar protein serta berbagai reaksi yang melibatkan enzim semuanya dapat berjalan dengan adanya metabolit.

Studi yang mempelajari tentang sintesis metabolit secara komprehensif oleh suatu sistem biologis disebut dengan *metabolome*. Analisis metabolomik mencakup indentifikasi dan kuantifikasi metabolit, baik metabolit intraseluler maupun metabolit ekstraseluler, dengan berat molekul di bawah 1000 Da menggunakan berbagai macam teknik (Villas-Bôas *et al.*, 2005). Beberapa teknik metabolomik diantaranya adalah: (1) *Metabolite targeted analysis*, yakni suatu studi yang dilakukan untuk mendeteksi dan kuantifikasi sebuah senyawa target berukuran kecil, (2) *metabolite fingerprinting*, yakni studi perbandingan dua atau lebih macam sampel berdasarkan tingkat kemiripan dari metabolit yang terkandung, dan (3)

*metabolite profiling*, yakni suatu teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi sejumlah kelompok metabolit yang berhubungan dengan suatu *metabolic pathway* (Krastanov, 2010).

*Metabolite profiling* sebagai salah satu teknik dalam studi metabolomik dinilai memiliki akurasi dan sensitifitas yang tinggi. Teknik tersebut memberikan informasi fungsional secara langsung terhadap fenotip dari metabolit dan informasi tidak langsung pada berbagai fenotip yang ditentukan oleh molekul tersebut (Lisec *et al.*, 2006). Menurut Krastanov (2010), *metabolite profiling* merupakan metode yang paling efektif dalam mengidentifikasi dan mempelajari produksi metabolit intraseluler maupun ekstraseluler dari sampel mikroorganisme. Beberapa metode dan instrumen yang digunakan dalam *metabolite profiling* diantaranya adalah: *Supercritical Fluid Chromatography Mass Spectrometry (SFCMS)*, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*, *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry (CEMS)*, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)*, dan *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS)* (Irwan and Junaidi, 2020).

## **2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)**

Studi *metabolite profiling* dengan menggunakan metode *gas chromatography-mass spectroscopy* (GC-MS) adalah termasuk yang paling banyak digunakan dan telah terbukti sebagai salah satu metode dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Selain itu, keunggulan GC-MS dibandingkan dengan teknik lainnya adalah reproduibilitas, resolusi, sensitivitas yang tinggi dan dapat digunakan untuk menganalisis sejumlah produk metabolit seperti: karbohidrat, asam lemak, asam-asam organik dan asam amino (Chaudhary, Verma and Saharan, 2020).

GC-MS merupakan kombinasi dari dua buah instrumen yakni *gas chromatography* (GC) dan *mass spectroscopy* (MS). GC berfungsi untuk memisahkan campuran metabolit menjadi senyawa-senyawa tunggal untuk kemudian dideteksi oleh MS berdasarkan pada pola fragmentasinya. Prinsip kerja GC-MS pada dasarnya adalah ketika sebuah sampel diinjeksikan ke dalam kromatogram, maka akan diubah menjadi fase uap dan dialirkan bersama gas

pembawa untuk melewati sebuah kolom kapiler. Dalam kolom tersebut terjadi proses pemisahan campuran senyawa menjadi fragmen-fragmen kecil yang kemudian akan dideteksi oleh MS. Mekanisme pembacaan fragmen oleh MS dilakukan dengan cara menembak fragmen-fragmen tersebut menggunakan elektron sehingga fragmen molekul akan terionisasi. Pola ionisasi yang dihasilkan oleh fragmen sampel akan dibandingkan dengan pola fragmentasi senyawa standard sehingga diperoleh prosentase *similarity index* (SI) (Fiehn, 2016).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini tergolong dalam desain penelitian dasar bersifat eksploratif, yakni dengan melakukan isolasi bakteri asam laktat (BAL) yang ada pada produk susu fermentasi di daerah Malang serta melakukan *profiling* terhadap metabolit yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Selain itu, juga digunakan metode penelitian eksperimental laboratorium, yakni pada uji aktivitas antimikroba *cell free supernatant* (CFS) isolat BAL terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

#### B. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan mulai dari Oktober 2021 sampai dengan Desember 2021 dengan skema penelitian sebagaimana tabel 3.1.

**Tabel 3.1.** *Timetable* penelitian

<b>Tahapan Penelitian</b>	<b>Waktu</b>
Isolasi BAL dari produk fermentasi	2 – 30 Oktober 2021
Identifikasi isolat BAL	30 Oktober – 13 November 2021
Uji antimikroba CFS isolat BAL terhadap <i>E. coli</i>	13 – 20 November 2021
Uji antimikroba CFS isolat BAL terhadap <i>S. aureus</i>	20 November – 4 Desember 2021
Analisis data dan penulisan laporan	4 – 5 Desember 2021



Penelitian ini akan dilangsungkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Isolasi BAL**

Tabung reaksi, cawan petri, *spreader* segitiga, inkubator CO<sub>2</sub>, neraca analitik digital, kertas timbang, *aluminium foil*, spatel logam, *magnetic stirrer*, kapas penyumbat, *laboratory autoclave*, *Laminar Airflow Biological Safety Cabinet* (BSC), Mikropipet beserta tip, mikrofilter, *syringe injector*, *microtube Eppendorf*®, *Cryo tube*, lemari pendingin.

Bahan utama dalam tahapan proses isolasi BAL adalah produk yoghurt dan kefir dari daerah Malang, *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) (Merck Millipore, No. katalog: 1106600500) + agar bakteriologis (Himedia, No. katalog: GRM026-500G) sebagai media selektif BAL dan *Yeast Milk Extract* (YME) sebagai media *stock culture*. Komposisi yang digunakan untuk membuat media *stock culture* adalah: *Yeast Extract Powder* (Himedia, No. katalog: RM027), susu skim (Tropicana Slim), D-Glucose *powder* (Merck, No. katalog: 1.08337.1000), Gliserol (Merck, No. katalog: 1.04091), aquadest.

#### **2. Identifikasi BAL berdasarkan Morfologi, Fisiologi dan Biokimia**

Alat: tabung reaksi, cawan petri, *object glass*, pinset, Bunsen, cawan porselen, spatel logam, ose gores, rak tabung, dan mikroskop cahaya. Bahan: cat *crystal violet*, cat lugol, iodin, alkohol 96%, safranin, *malachite green*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, media *trypticase soy agar*, media semi padat *sulfide indole motility*.

#### **3. Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli***

Peralatan yang digunakan antara lain cawan petri, ose, lampu spiritus, tabung duram, gelas ukur, aluminium foil, mikroskop, cover gelas, objek gelas, timbangan digital, gelas beaker, batang L, mikropipet, pipet, kertas label, masker, dan sarung tangan, autoclav, rak tabung, kapas, kulkas, inkubator, sentrifuge, kertas saring (membran milipore), corong, perfolator steril, jangka sorong, batang pengaduk.

Bahan penelitian yang digunakan antara lain yogurt, media MRS (*deMan-Rogosa-Sharpe*) agar, media MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) broth, larutan PBS (*phosphate buffer saline*), media Nutrient Agar (NA), Media *Muller Hinton Agar*

(MHA), larutan buffer, larutan kristal violet, NaCl fisiologis, alkohol 96%), Aquades, standar 0,5 Mc Farland, Larutan Iodin, Safranin, minyak emersi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Hidrogen peroksida), cakram antibiotik metisilin.

#### **D. Prosedur Penelitian**

##### **1. Isolasi BAL (Duhan *et al.*, 2013)**

Sebanyak 10 ml kefir dan yoghurt dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibuat seri pengencerannya mulai dari 10<sup>-1</sup> sampai dengan 10<sup>-4</sup> dengan H<sub>2</sub>O. Keempat larutan kefir susu kambing ditanam di media agar MRS (*de Mann Rogosa Sharpe*) steril dengan metode cawan sebar. Cawan diinkubasi dalam kondisi mikroaerofilik (5% CO<sub>2</sub>) dengan suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang berhasil tumbuh diinokulasi ke cawan petri berisi media agar MRS yang baru dengan metode goresan. Cawan diinkubasi dalam kondisi mikroaerofilik dengan suhu 37°C selama 48 jam.

##### **2. Identifikasi BAL berdasarkan Morfologi, Fisiologi dan Biokimia**

Karakterisasi morfologi BAL dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi morfologi BAL secara makroskopis dilakukan dengan melihat secara langsung morfologi koloni isolat BAL yang berhasil tumbuh pada media agar MRS. Karakteristik BAL yang dapat diamati secara makroskopis meliputi: Bentuk koloni, warna, ukuran, tepi koloni, elevansi, dan konsistensi koloni. Karakterisasi morfologi BAL secara mikroskopis dilakukan dengan uji pewarnaan Gram dan uji sporulasi. Karakterisasi fisiologi isolat BAL produk susu fermentasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji motilitas, sedangkan karakterisasi biokimia meliputi uji oksidase dan katalase (Muzaifa, 2014).

##### **3. Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli***

Media MHA (*Muller Hinton Agar*) sebanyak 7,2 gram dan ditambahkan dengan 250 mL aquades, kemudian dihomogenkan dengan dipanaskan hingga jernih. Media MHA dituang ke dalam 12 cawan petri yang akan digunakan dan media dibiarkan hingga padat. Cakram antibiotik (kontrol positif) metisilin dan cakram blank disiapkan untuk uji aktivitas antibakteri. Diambil sebanyak 10 µL biakan *S. aureus* dan *E. coli* kemudian disebar di permukaan media MHA. Cakram antibiotik kloramfenikol 30µg diambil menggunakan pinset steril dan diletakkan

pada permukaan tengah media MHA sebagai kontrol positif. Semua sampel yang telah siap lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, akan muncul zona hambat. Dilakukan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

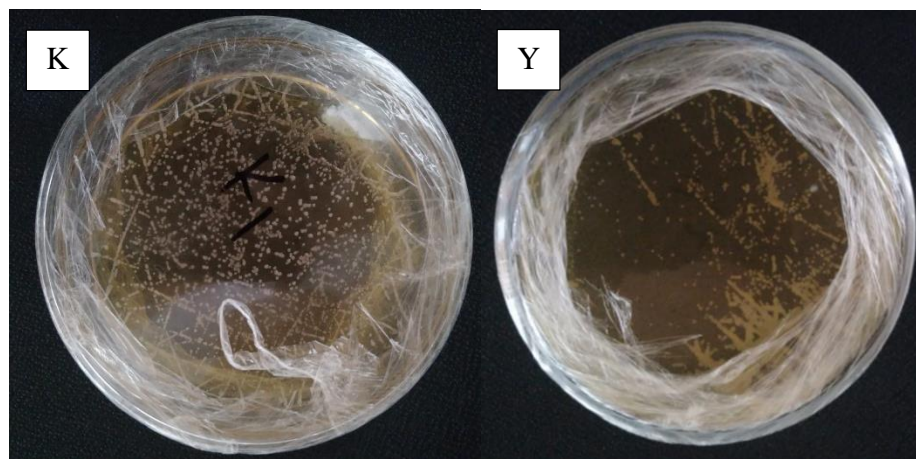
#### A. Hasil Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kefir dan yoghurt yang berasal dari daerah Malang (Gambar 4.1). Kefir berasal dari Kecamatan Sukun, Kota Malang sedangkan yoghurt berasal dari Kecamatan Pujon Kabupaten Malang. Setelah dibuat seri pengenceran 1 hingga 4 kali, kemudian ditumbuhkan dalam media *deMann Rogose Sharpe Agar* (MRSA) menggunakan metode *spread*, diperoleh sejumlah koloni BAL yang berasal dari kefir dan yoghurt. Dipilih satu koloni secara acak untuk kemudian diinokulasikan ke dalam media MRSA yang baru, agar diperoleh biakan murni BAL (Gambar 4.2).



**Gambar 4.1. Sampel produk susu fermentasi yang berasal dari daerah Malang.** (A) Produk Kefir produksi ThalitaFata Farm CV. Tiga Nada Wisia Perkasa asal Sukun, dan (B) Produk yoghurt produksi CV. As-Syauqi asal Pujon.

Biakan BAL yang berhasil tumbuh diamati morfologinya baik secara makroskopis dan mikroskopis sebelum dilakukan uji fisiologis dan biokimia. Hasil pengamatan koloni isolat BAL disajikan dalam Tabel 4.1. Uji fisiologis sel meliputi pewarnaan Gram, uji motilitas, dan uji pembentukan endospora; sedangkan uji biokimia meliputi uji katalase, oksidase dan fermentasi karbohidrat.



**Gambar 4.2. Koloni Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL).** (K) Isolat BAL dari sampel produk kefir, dan (Y) Isolat BAL dari sampel produk yoghurt.

**Tabel 4.1. Morfologi Koloni Isolat BAL dari Sampel Kefir dan Yoghurt di Daerah Malang**

Sampel	Bentuk	Diameter	Tepi	Elevansi	Konsistensi
K	Bulat	2,03	Rata	Datar	Kering
Y	Bulat	2,32	Rata	Datar	Kering

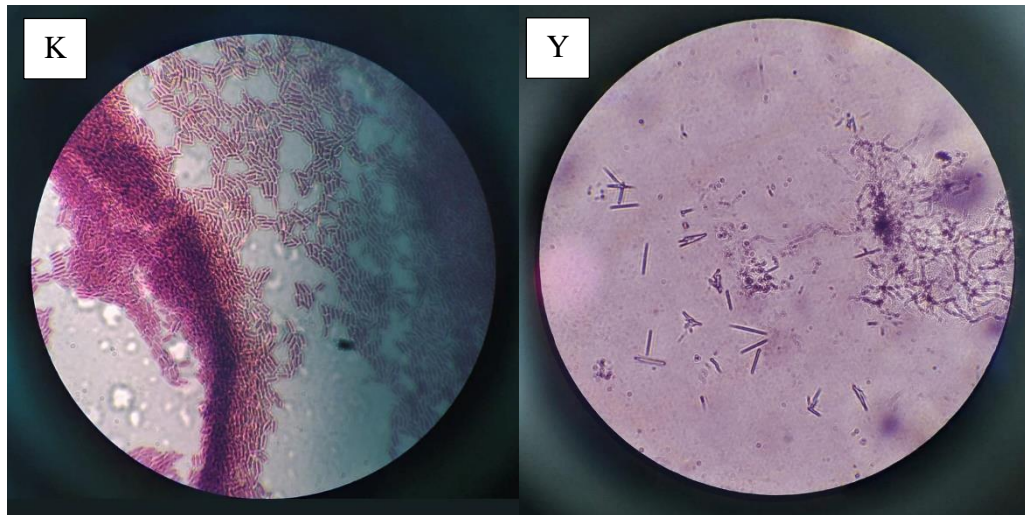
Keterangan: (K) Isolat BAL dari produk kefir; (Y) Isolat BAL dari produk yoghurt

### 1. Pengamatan Morfologi Sel

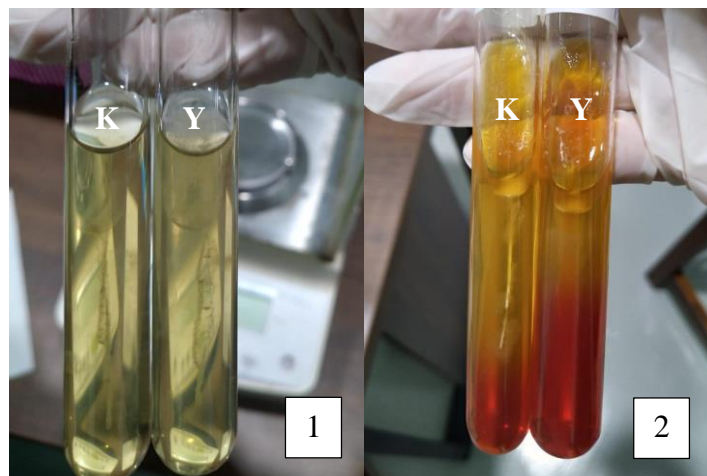
Isolat bakteri yang berhasil tumbuh dari sampel K dan Y diamati morfologinya secara mikroskopis melalui metode pewarnaan Gram. Hasil pengamatan isolat BAL di bawah mikroskop dengan metode pewarnaan Gram menunjukkan morfologi sel bakteri berwarna ungu-magenta berbentuk basil yang tersusun secara berrantai (Gambar 4.3).

### 2. Uji Fisiologi Bakteri

Karakteristik fisiologis isolat bakteri diamati melalui uji motilitas dengan cara menusukkan *overnight culture* isolat bakteri ke dalam tabung reaksi berisi media *nutrient agar* (NA) menggunakan jarum ose steril, kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil positif tercatat dengan adanya jejak pertumbuhan yang melebar dari alur tusukan jarum, namun dalam uji motilitas isolat bakteri dari sampel K dan Y tidak ditemui adanya perubahan (Gambar 4.4.1).



**Gambar 4.3. Gambaran Mikroskopik Isolat BAL dari sampel kefir dan yoghurt (1000×).** (K) Isolat BAL dari sampel produk kefir, dan (Y) Isolat BAL dari sampel produk yoghurt.



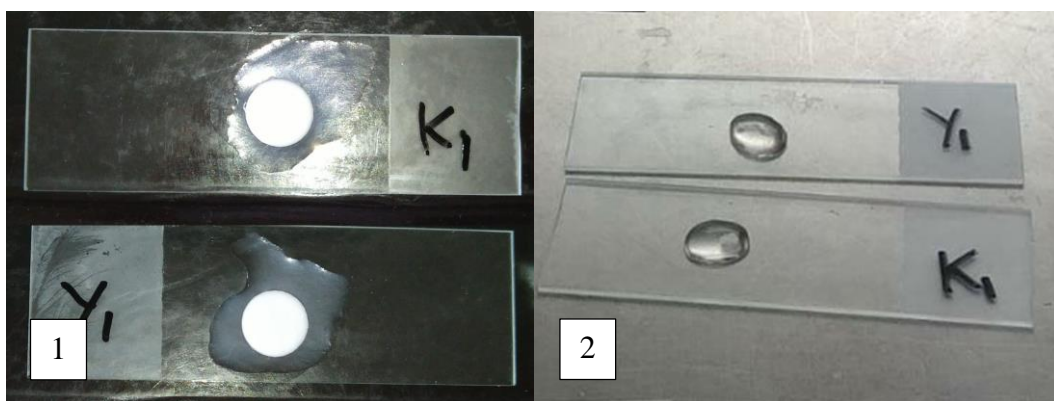
**Gambar 4.4. Hasil Uji Motilitas (1) dan Uji Fermentasi Karbohidrat (2) Isolat BAL.** (K) Isolat BAL dari sampel produk kefir, dan (Y) Isolat BAL dari sampel produk yoghurt.

### 3. Uji Biokimia Bakteri

Aktivitas biokimiawi isolat bakteri dari sampel kefir dan yoghurt dari Daerah Malang dikarakterisasi dengan uji fermentasi karbohidrat, uji oksidase, dan katalase. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara inokulasi *overnight culture* isolat bakteri yang diuji ke dalam tabung reaksi berisi media miring *triple sugar iron agar* (TSIA) menggunakan jarum ose, kemudian biakan diinkubasi pada

suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas fermentasi karbohidrat isolat bakteri ditunjukkan dengan perubahan warna substrat karbohidrat dalam media dari merah menjadi kuning (Kosasi, Lolo and Sudewi, 2019) Dalam penelitian ini, terjadi perubahan warna media dari merah ke kuning dengan adanya inokulum berupa isolat bakteri dari kefir (K) dan yoghurt (Y) (Gambar 4.4.2).

Uji oksidase isolat bakteri dilakukan dengan cara meneteskan *overnight culture* bakteri uji pada *oxidase disc* yang telah berisi N,N-dimetil-p-paraphenylenediamine oksalat, asam askorbat dan  $\alpha$ -naftol. Hasil uji positif apabila terdapat perubahan warna *disc* dari putih ke biru-ungu dalam rentang waktu 10 – 30 detik setelah perlakuan. Hasil pengamatan pada sampel isolat bakteri dari kefir (K) dan yoghurt (Y) tidak terjadi perubahan warna (Gambar 4.5.1). Hal ini menandakan bahwa tidak terdapat aktivitas enzim oksidase pada kedua isolat bakteri.



**Gambar 4.5. Hasil Uji Oksidase (1) dan Uji Katalase (2) Isolat BAL.** (K) Isolat BAL dari sampel produk kefir, dan (Y) Isolat BAL dari sampel produk yoghurt.

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui karakteristik bakteri uji dalam memproduksi enzim katalase yang berfungsi untuk mengurai hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi oksigen ( $O_2$ ) dan air ( $H_2O$ ). Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan reagen  $H_2O_2$  pada *object glass* yang telah dioles suspensi bakteri uji. Aktivitas katalase positif ditunjukkan dengan munculnya gelembung oksigen yang dapat diamati. Hasil uji katalase terhadap isolat bakteri sampel kefir dan yoghurt dari Daerah Malang menunjukkan hasil negatif (Gambar 4.5.2). Adapun hasil



keseluruhan uji morfologi, fisiologi dan biokimia isolat BAL ditampilkan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Karakteristik Morfologi, Fisiologi dan Biokimia Isolat BAL dari Sampel Kefir dan Yoghurt di Daerah Malang**

Uji Karakteristik	Sampel	
	K	Y
<b>Morfologi</b>		
Gram	Positif	Positif
Bentuk Sel	Basil	Basil
<b>Fisiologi</b>		
Motilitas	Negatif	Negatif
<b>Biokimia</b>		
Fermentasi karbohidrat	Positif	Positif
Oksidase	Negatif	Negatif
Katalase	Negatif	Negatif

Keterangan: (K) Isolat BAL dari produk kefir; (Y) Isolat BAL dari produk yoghurt

BAL adalah bakteri Gram positif berbentuk basil maupun kokus bersifat anaerob fakultatif penghasil asam laktat melalui proses fermentasi karbohidrat. BAL bersifat non-motil, asidotoleran, mikroaerotoleran, tidak menghasilkan spora, serta bersifat katalase dan oksidase negatif (Ekundayo, 2014). Hasil uji morfologi, fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diperoleh dari kefir dan yoghurt dalam penelitian ini memenuhi karakteristik sebagai BAL.

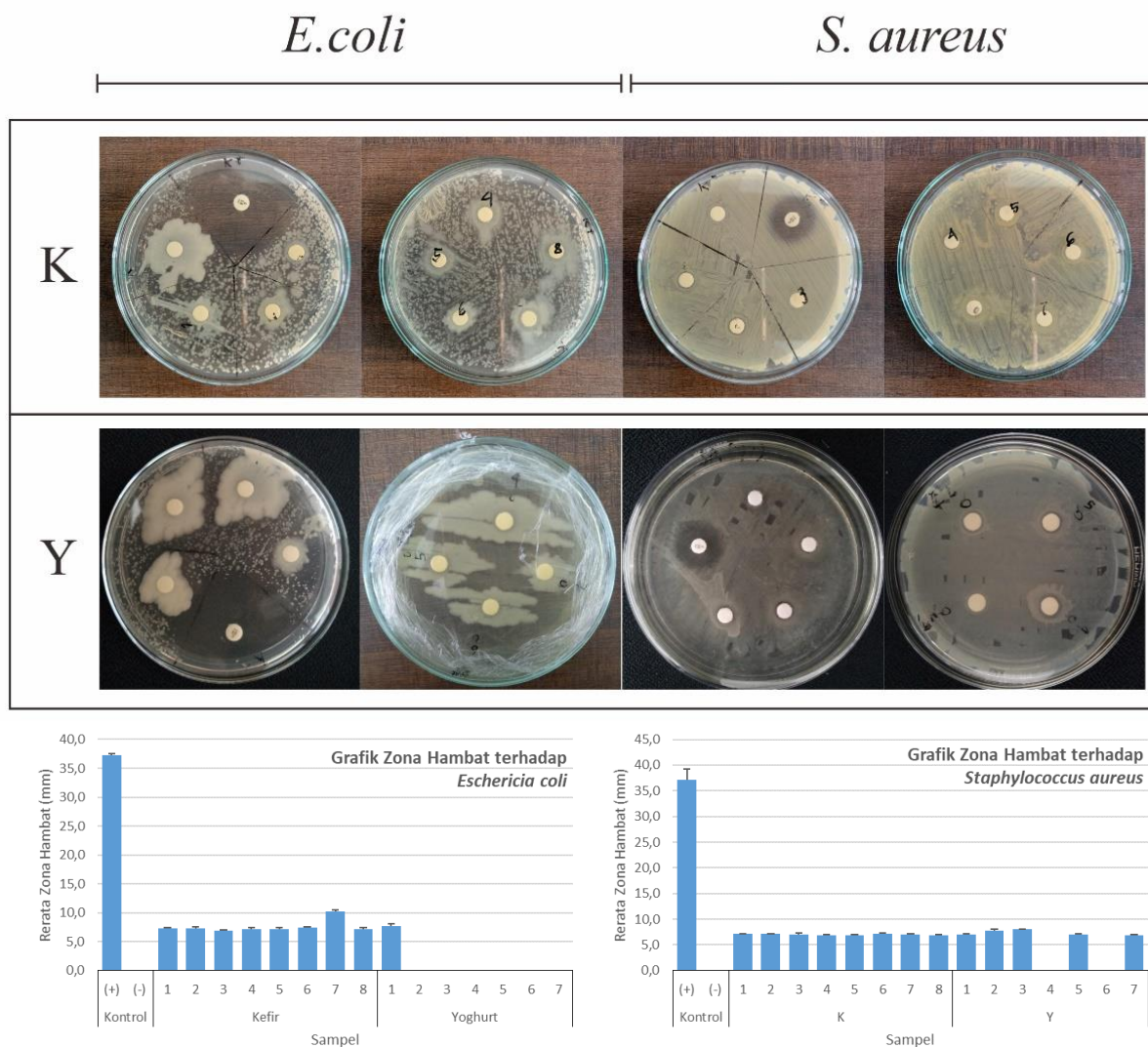
#### **B. Aktivitas Antibakteri Isolat BAL terhadap *E. coli* dan *S. aureus***

Untuk menguji aktivitas antibakteri isolat BAL sampel kefir dan yoghurt dari Daerah Malang, dilakukan uji dengan metode *disc diffusion* terhadap *cell free supernatant* (CFS) masing-masing sampel. CFS dipanen dengan menumbuhkan biakan murni isolat BAL dalam media *deMan Rogose Sharpe broth* (MRSB) pada kondisi suhu 37°C hingga mencapai kekeruhan standar McFarland 0,5 – 1. Koloni homogen yang tumbuh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000x g selama 10 menit. Sebanyak 1µL supernatan dipindahkan ke gelas arloji, kemudian *paper disc* diletakkan di atasnya hingga terbasahi seluruhnya.

*Paper disc* sampel, yakni yang telah mengandung CFS serta kontrol positif (30µg kloramfenikol) dan negatif (aquades) diletakkan di atas media MHA (*Muller Hinton Agar*) yang sebelumnya telah ditanam dengan bakteri uji. Bakteri yang



digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Cawan petri yang telah mengandung biakan *E. coli* maupun *S. aureus* serta *paper disc* dalam media MHA diinkubasi pada kondisi suhu 37°C selama 24 jam untuk kemudian diamati pembentukan zona hambatnya. Diameter zona hambat yang dihasilkan dari uji aktivitas antibakteri CFS isolat BAL terhadap *E. coli* dan *S. aureus* disajikan pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.3.



**Gambar 4.6. Hasil Uji Zona Hambat Pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*.** Gambar atas: Visualisasi pembentukan zona hambat oleh 8 isolat zona hambat oleh 8 isolat BAL dari kefir (K); 7 isolat BAL dari yoghurt (Y); kontrol positif (kloramfenikol 30µg) dan kontrol negatif (akuades). Gambar bawah: Grafik rerata zona hambat sampel terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

**Tabel 4.3. Data Hasil Pengukuran Zona Hambat Sampel Kefir dan Yoghurt terhadap Pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus***

Sampel	Zona hambat per replikasi (mm)			Rerata (mm) ±SD	
	I	II	III		
<i>Escherichia coli</i>					
Kontrol (+)	37,4	37,4	37,0	37,3 ± 0,2	
Kontrol (-)	0	0	0	0 ± 0	
K	1	7,2	7,1	7,4	7,2 ± 0,2
	2	7,4	6,9	7,4	7,2 ± 0,3
	3	6,9	7,0	6,9	6,9 ± 0,1
	4	7,4	7,0	6,9	7,1 ± 0,3
	5	6,8	7,4	7,1	7,1 ± 0,3
	6	7,3	7,4	7,5	7,4 ± 0,1
	7	10,1	10,6	10,1	10,3 ± 0,3
	8	7,4	6,9	7,2	7,2 ± 0,3
Y	1	7,4	7,4	8,1	7,6 ± 0,4
	2	0	0	0	0 ± 0
	3	0	0	0	0 ± 0
	4	0	0	0	0 ± 0
	5	0	0	0	0 ± 0
	6	0	0	0	0 ± 0
	7	0	0	0	0 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Kontrol (+)	34,6	38,6	38,0	37,1 ± 2,2	
Kontrol (-)	0	0	0	0 ± 0	
K	1	7,1	7,1	7,1	7,1 ± 0
	2	7,1	7,2	7,2	7,2 ± 0,1
	3	6,8	7,0	7,3	7,0 ± 0,3
	4	7,1	6,8	6,8	6,9 ± 0,2
	5	6,9	7,1	6,8	6,9 ± 0,2
	6	7,1	7,3	7,2	7,2 ± 0,1
	7	7,1	7,0	6,9	7,0 ± 0,1
	8	6,9	6,8	7,1	6,9 ± 0,2
Y	1	7,0	7,2	7,0	7,1 ± 0,1
	2	7,7	8,1	7,6	7,8 ± 0,3
	3	8,1	8,1	8,0	8,1 ± 0,1
	4	0	0	0	0 ± 0
	5	7,1	7,0	6,9	7,0 ± 0,1
	6	0	0	0	0 ± 0
	7	6,7	6,8	7,1	6,9 ± 0,2

Keterangan: (K) Isolat BAL dari produk kefir; (Y) Isolat BAL dari produk yoghurt

Penelitian ini menggunakan cakram/*disc* berisi antibiotik kloramfenikol 30µg sebagai kontrol positif. Kloramfenikol dipilih karena bersifat spektrum luas sehingga sensitif terhadap bakteri Gram negatif, seperti *E. coli* maupun bakteri Gram positif, seperti *S. aureus*. Selain itu, kloramfenikol dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui mekanisme hambatan sintesis protein (Mastra, 2018). Berdasarkan hasil uji, diperoleh rerata diameter zona hambat kloramfenikol

terhadap *E. coli* ( $37,3 \pm 0,2$  mm) dan *S. aureus* ( $37,1 \pm 2,2$  mm) berada pada kategori *susceptible* ( $\geq 18$  mm) (Hudzicki, 2012). Sedangkan akuades steril, yang digunakan sebagai kontrol negatif pada penelitian ini tidak menimbulkan zona hambat (0 mm) baik pada biakan *E. coli* maupun *S. aureus*. Hasil uji dari kontrol sampel menunjukkan bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini sensitif terhadap agen antimikroba, sekaligus terkonfirmasi juga bahwa pelarut dan metode sterilisasi yang digunakan dalam preparasi media selama dilakukannya uji adalah steril dan tidak mengandung senyawa yang bersifat antimikroba. Penggunaan kontrol positif dan kontrol negatif dalam studi mikrobiologi adalah penting, kaitannya untuk menghindari bias dan menjamin validitas suatu uji dengan menghilangkan variabel-variabel lain yang dapat berpengaruh pada hasil uji (Hornung, Zwitterink and Kuijper, 2019).

Hasil uji 8 isolat BAL yang berasal dari sampel kefir menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, sedangkan dari 7 isolat BAL yang berasal dari yoghurt hanya Y1 yang memiliki aktivitas penghambatan. Isolat BAL dari kefir yang memiliki aktivitas antimikroba paling baik terhadap *E. coli* adalah sampel K7 dengan daya hambat sebesar  $10,3 \pm 0,3$  mm. Sedangkan isolat BAL yang berasal dari yoghurt dengan daya hambat paling baik adalah Y1, yakni sebesar  $7,6 \pm 0,4$  mm. Meskipun demikian, rerata zona hambat isolat BAL baik dari kefir maupun yoghurt tercatat masih jauh lebih kecil ( $0 - 10,3 \pm 0,3$  mm) dibandingkan dengan kontrol positif ( $37,3 \pm 0,2$  mm).

*Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif yang menghuni mikroekosistem usus manusia. Meskipun termasuk dalam bakteri flora normal yang ada pada manusia, sejumlah galur *E. coli* dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, infeksi saluran nafas hingga pneumonia (CDC, 2014). Aktivitas antimikroba isolat BAL terhadap *E. coli* dalam penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Adeniyi *et.al.* (2015) yang melaporkan bahwa sejumlah spesies BAL, seperti *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* dan *Weissella confusa* yang diisolasi dari feses sapi memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* yang berasal dari lingkungan sama. Karimi *et al.* (2018) juga melaporkan bahwa hasil uji BAL probiotik, yakni

*Lactobacillus plantarum* dan *Weissella paramesenteroides* memiliki efek antibakteri yang baik terhadap *E. coli* strain O157:H7 yang menyebabkan diare. BAL memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui sejumlah mekanisme aksi, di antaranya adalah: produksi senyawa-senyawa seperti bakteriosin dan biosurfaktan, serta produksi biofilm. Struktur biofilm yang dibentuk oleh BAL terbukti efektif dalam menjerap bakteri patogen yang berada pada mikroenvironment yang sama sehingga mampu menghalangi pertumbuhan bakteri-bakteri enterohemoragic lainnya seperti: *E. coli* O157: H7, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* KKCCM 11806, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 11321, *Listeria monocytogenes* Scott A, and *B. cereus* (Gómez *et al.*, 2016).

Uji aktivitas antibakteri isolat BAL dari sampel kefir dan yoghurt di Daerah Malang terhadap bakteri *S. aureus* menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan terhadap *E. coli*. Hal ini berdasarkan data uji bahwa dari 8 isolat BAL dari kefir dan 7 isolat BAL dari yoghurt, hanya terdapat 2 isolat (Y4 dan Y6) yang tidak menunjukkan adanya zona hambat. Di antara ke-15 isolat BAL yang diuji, sampel Y3 menunjukkan hambatan pertumbuhan *S. aureus* terbesar, dengan zona hambat sebesar  $8,1 \pm 0,3$  mm. Meskipun demikian zona hambat yang dihasilkan jauh lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif (kloramfenikol  $\mu\text{g}$ ) yakni sebesar  $37,1 \pm 2,2$  mm.

*S. aureus* adalah bakteri Gram positif yang banyak ditemui pada lapisan epidermis manusia yang sehat. Pada kondisi patologis tertentu, *S. aureus* dapat bertranslokasi menuju jaringan serta organ lainnya sehingga memicu timbulnya penyakit infeksi seperti bakteremia, pneumonia, endokarditis dan osteomyelitis (CDC, 2011). Kolonisasi *S. aureus* yang tidak terkontrol merupakan faktor utama penyebab terjadinya infeksi. BAL yang terkandung dalam kefir dan yoghurt terbukti mampu menghambat kolonisasi *S. aureus*. Hal ini disebabkan oleh senyawa-senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh BAL. Menurut Christensen *et al.* (2021) produksi asam laktat yang mengakibatkan turunnya pH lingkungan menjadi mekanisme utama BAL dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Penurunan pH pada lingkungan tumbuh *S. aureus* memicu *down*-regulasi gen-gen pengkode protein ribosom serta gen-gen penting terkait sintesis nukleotida, metabolisme asam lemak dan lipoprotein

sehingga mengakibatkan penurunan laju pertumbuhan *S. aureus* (Bore *et al.*, 2007). Selain melalui mekanisme penurunan pH, hambatan pertumbuhan *S. aureus* oleh BAL juga dapat melalui produksi bakteriosin. Bakteriosin adalah senyawa peptida yang diproduksi oleh bakteri untuk melawan bakteri lainnya sebagai respon pertahanan diri. Bakteriosin yang diekstraksi dari isolat BAL pada bekasam, produk makanan fermentasi dari bahan dasar ikan, dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL menyerang membran sitoplasma *S. aureus* dengan menghasilkan *cytoplasmic membrane pores*, menyisip pada membran sel untuk meningkatkan permeabilitasnya serta menghambat pembentukan septa (Sari, Suryanto and Yurnaliza, 2018). Lubang yang terbentuk pada membran sitoplasma menstimulasi permeabilitas membran dan mengganggu keseimbangan ADP/ATP akibat kebocoran fosfat anorganik. Fosfat yang lepas menurunkan jumlah proton serta beberapa kation bivalen seperti  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$ , penurunan kation menyebabkan netralisasi pada muatan negatif fosfolipid, peningkatan permeasi ion  $K^{+}$  dan  $Mg^{+}$ , asam amino, dan ATP. Kegagalan dalam mempertahankan jumlah proton dalam sel mengakibatkan kematian sel akibat tidak dapat menjalankan fungsi sel yang membutuhkan energi (Gajic, 2003).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

1. Karakteristik bakteri asam laktat (BAL) yang terkandung dalam produk susu fermentasi di Malang adalah berbetuk basil, Gram positif, bersifat non-motil, katalase negatif, oksidase negatif dan mampu menghasilkan asam laktat melalui proses fermentasi karbohidrat.
2. Isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan diameter zona hambat sampel kefir isolat K7 sebesar  $10,3 \pm 0,3$  mm dan sampel yoghurt isolat Y1 sebesar  $7,6 \pm 0,4$  mm.
3. Isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam produk susu fermentasi di Malang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat sampel kefir isolat K2 dan K6 sebesar  $7,2 \pm 0,1$  mm dan sampel yoghurt isolat Y3 sebesar  $8,1 \pm 0,1$  mm.

#### **B. Saran**

1. Perlu dilakukan identifikasi spesies BAL yang terkandung dalam produk susu fermentasi secara genomik menggunakan metode *gene sequencing* 16S rRNA.
2. Untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh senyawa antibakteri yang diproduksi oleh BAL diluar pengaruh penurunan pH lingkungan akibat produksi asam laktat, hendaknya perlu dilakukan ekstraksi *cell free supernatant* (CFS) dengan menambahkan NaOH untuk menetralkan pH.
3. Perlu dilakukan studi lanjut untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam *cell free supernatant* (CFS) BAL, khususnya yang berperan dalam aktivitas antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adeniyi, B. A., Adetoye, A. and Ayeni, F. A. (2015) ‘Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens’, *African health sciences*. Makerere Medical School, 15(3), pp. 888–895. doi: 10.4314/ahs.v15i3.24.
- Badan Standardisasi Nasional (2019) *Petunjuk Teknis Skema Sertifikasi Produk Yogurt, Petunjuk Teknis Skema Sertifikasi Produk Yogurt*. Indonesia: [https://bsn.go.id/uploads/download/skema\\_yogurt\\_%E2%80%93\\_lampiran\\_lxxix\\_perka\\_bsn\\_11\\_tahun\\_2019.pdf](https://bsn.go.id/uploads/download/skema_yogurt_%E2%80%93_lampiran_lxxix_perka_bsn_11_tahun_2019.pdf). Available at: [https://bsn.go.id/uploads/download/skema\\_yogurt\\_%E2%80%93\\_lampiran\\_lxxix\\_perka\\_bsn\\_11\\_tahun\\_2019.pdf](https://bsn.go.id/uploads/download/skema_yogurt_%E2%80%93_lampiran_lxxix_perka_bsn_11_tahun_2019.pdf).
- Bağder Elmacı, S. *et al.* (2015) ‘Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey’, *Folia Microbiologica*, 60(3). doi: 10.1007/s12223-014-0363-x.
- Bore, E. *et al.* (2007) ‘Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis.’, *Microbiology (Reading, England)*. England, 153(Pt 7), pp. 2289–2303. doi: 10.1099/mic.0.2007/005942-0.
- CDC (2011) *Staphylococcus aureus in Healthcare Settings*. Available at: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>.
- CDC (2014) *E. coli (Escherichia coli)*. Available at: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>.
- Chaudhary, A., Verma, K. and Saharan, B. S. (2020) ‘A GC-MS based metabolic profiling of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional food products’, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), pp. 657–672. doi: 10.22207/JPAM.14.1.68.
- Christensen, I. B. *et al.* (2021) ‘Targeted Screening of Lactic Acid Bacteria With Antibacterial Activity Toward *Staphylococcus aureus* Clonal Complex Type 1 Associated With Atopic Dermatitis’, *Frontiers in Microbiology*, p. 2669. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.733847>.
- Coucheney, E. *et al.* (2008) ‘Gas chromatographic metabolic profiling: A sensitive tool for functional microbial ecology’, *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 75(3), pp. 491–500. doi: 10.1016/j.mimet.2008.07.029.
- Detha, A. *et al.* (2020) ‘Karakteristik Antimikroba Bakteri Asam Laktat Susu Kuda Sumba Terhadap Bakteri *Salmonella Typhimurium*’, *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, 21(1), pp. 50–56. doi: 10.21776/ub.jtapro.2020.021.01.6.
- Duhan, J. S. *et al.* (2013) ‘Bacteriocins from lactic acid bacteria’, *Biotechnology*:

- Prospects and Applications*, 9788132216(March), pp. 127–141. doi: 10.1007/978-81-322-1683-4\_11.
- Ekundayo, F. O. (2014) ‘Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soils of three fruit trees , fish and ogi’, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), pp. 991–998.
- Fiehn, O. (2016) ‘Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling.’, *Current protocols in molecular biology*, 114. doi: 10.1002/0471142727.mb3004s114.
- Fuochi, V. *et al.* (2019) ‘Metabolic characterization of supernatants produced by *Lactobacillus* spp. With in vitro anti-*Legionella* activity’, *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2019.01403.
- Gajic, O. (2003) ‘Relationships between MDR proteins, bacteriocin production and proteolysis in *Lactococcus lactis*’, *PhD Thesis, University of Groningen, The Netherlands*, pp. 1–105.
- Gómez, N. C. *et al.* (2016) ‘Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation ’, *Frontiers in Microbiology* , p. 863. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00863>.
- Harjiyanti, M., Pramono, Y. B. and Mulyani, S. (2013) ‘Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan, Vol 2, No 2 (2013)’, 2(2), p. 7539.
- Hornung, B. V. H., Zwiittink, R. D. and Kuijper, E. J. (2019) ‘Issues and current standards of controls in microbiome research’, *FEMS microbiology ecology*. Oxford University Press, 95(5), p. fiz045. doi: 10.1093/femsec/fiz045.
- Hudzicki, J. (2012) ‘Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information’, *American Society For Microbiology*, (December 2009), pp. 1–13. Available at: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>.
- Irwan, A. and Junaidi, A. B. (2020) ‘Kajian Awal Metabolomik Pada Ekstrak Metanol Daging Buah Limau Kuit Dengan Analisis Gc-Ms Tidak Tertarget’, *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, 5(April), pp. 27–31. Available at: limau kuit, maserasi, metanol, metabolomik, GC-M.
- Karimi, S. *et al.* (2018) ‘The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157:H7’, *Electronic Physician*, 10(3), pp. 6548–6553. doi: 10.19082/6548.
- Kasra-Kermanshahi, R. and Mobarak-Qamsari, E. (2015) ‘Inhibition effect of Lactic acid bacteria against food born pathogen, *Listeria monocytogenes*’, *Applied Food Biotechnology*, 2(4), pp. 11–19. doi: 10.22037/afb.v2i4.8894.
- Keles, G. and Demirci, U. (2011) ‘The effect of homofermentative and



- heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 164(1–2), pp. 21–28. doi: 10.1016/j.anifeeds.2010.11.017.
- Kosasi, C., Lolo, W. A. and Sudewi, S. (2019) 'ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN ALGA *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh SERTA IDENTIFIKASI SECARA BOKIMIA', *Pharmakon*, 8(2), p. 351. doi: 10.35799/pha.8.2019.29301.
- Krastanov, A. (2010) 'Metabolomics - The state of art', *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24(1), pp. 1537–1543. doi: 10.2478/V10133-010-0001-y.
- Lisec, J. *et al.* (2006) 'Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants', *Nature Protocols*, 1(1). doi: 10.1038/nprot.2006.59.
- Liu, W. *et al.* (2014) 'Biodiversity of Lactic Acid Bacteria', in *Lactic Acid Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-017-8841-0\_2.
- Lopitz-Otsoa, F. *et al.* (2006) 'Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables', *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(2). doi: 10.1016/S1130-1406(06)70016-X.
- Machado, A. *et al.* (2013) 'Microbiological , technological and therapeutic properties of kefir : a natural probiotic beverage', *Brazilian Journal of Microbiology*, 349(2), pp. 341–349.
- Mastra, N. (2018) 'PERBEDAAN ZONA HAMBAT PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* PADA BERBAGAI KONSENTRASI REBUSAN DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) SECARA IN VITRO', *Meditory : The Journal of Medical Laboratory*, 5(2), pp. 92–100. doi: 10.33992/m.v5i2.138.
- Muzaifa, M. (2014) 'IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT INDIGENOUS DARI BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)', *Jurnal Sagu*, 13(1), pp. 8–13. Available at: <http://ejournal.unri.ac.id/index.php/JSG/article/view/2130>.
- Ot'es, S. and Cagindi, O. (2003) 'Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects', *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), pp. 54–59. doi: 10.3923/pjn.2003.54.59.
- Plessas, S. *et al.* (2017) 'Microbiological exploration of different types of Kefir grains', *Fermentation*, 3(1), pp. 1–10. doi: 10.3390/fermentation3010001.
- Pothuraju, R. *et al.* (2017) 'Fermented milk in protection against inflammatory mechanisms in obesity', *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support*, pp. 389–401. doi: 10.1016/B978-0-12-805417-8.00029-9.

- Raras, T. Y. M. *et al.* (2019) 'Anti-Biofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*', *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2), pp. 983–992. doi: 10.22207/JPAM.13.2.35.
- Sari, M., Suryanto, D. and Yurnaliza (2018) 'Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from bekasam against *staphylococcus aureus* ATCC 25923, *escherichia coli* ATCC 25922, and *salmonella sp*', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130(1). doi: 10.1088/1755-1315/130/1/012011.
- Setyowati, H. and Setyani, W. (2009) 'Kefir: a new role as nutraceuticals', *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 7(5), pp. 200–209. doi: 10.20885/jkki.vol7.iss5.art5.
- Shokri, D. *et al.* (2018) 'The Inhibition Effect of Lactobacilli Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), pp. 34–42. doi: 10.1007/s12602-017-9267-9.
- Villas-Bôas, S. G. *et al.* (2005) 'Mass spectrometry in metabolome analysis', *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), pp. 613–646. doi: 10.1002/mas.20032.
- Wimmerstedt, A. and Kahlmeter, G. (2008) 'Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*', *Clinical Microbiology and Infection*, 14(4). doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01946.x.
- Wolfender, J.-L. *et al.* (2015) 'Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts', *Journal of Chromatography A*, 1382. doi: 10.1016/j.chroma.2014.10.091.