

Aktivitas Antimikroba dan Analisis Gen Plantaricin F dari Isolat *Lactobacillus* Asal Buah-buahan Tropis

(Antimicrobial Activity and Gene Analysis of Plantaricin F of *Lactobacillus* Originated from Tropical Fruits)

TITIN YULINERY*, NOVIK NURHIDAYAT

**Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
(P2B LIPI), Jalan Raya Jakarta Km. 46, Cibinong.**

Diterima 22 Oktober 2012, Disetujui 22 Agustus 2013

Abstrak: *Lactobacillus* yang berasal dari buah-buahan tropis dapat digunakan sebagai probiotik dan berpotensi mencegah penyakit pada saluran pencernaan karena menghasilkan bakteriosin. Salah satu bakteriosin adalah plantaricin F yang dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum*. Plantaricin F mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri beberapa isolat *Lactobacillus* terhadap 5 bakteri uji dan menganalisa ekspresi gen plantaricin F. Dari sepuluh isolat *Lactobacillus* terpilih, tujuh isolat mampu menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Isolat TB (NK) memiliki daya hambat paling besar terhadap *E. coli* yakni 2,05 cm, dan dua kali lebih kuat dibandingkan kontrol kloramfenikol. Sebagai konfirmasi dilakukan analisis gen plantaricin F dengan RT-PCR. Hasil pengujian RT-PCR menunjukkan bahwa ukuran gen plantaricin F adalah ± 70 bp. Nilai ekspresi relatif gen plantaricin F paling tinggi ditunjukkan oleh isolat Mar A2 dengan nilai 10,676 Au, diikuti oleh isolat TB (NK) dengan nilai 2,9207 Au, sedangkan isolat TB (CK) memiliki nilai ekspresi relatif gen plantaricin F paling rendah yaitu sebesar 0,5141 Au. Isolat *Lactobacillus* TB (NK) dapat dijadikan kandidat probiotik dan antibiotik alternatif untuk mencegah penyakit saluran pencernaan.

Kata kunci: plantaricin F, antimikroba, *Lactobacillus*, probiotik, buah-buahan tropis.

Abstract: *Lactobacillus* isolated from tropical fruits can be used as probiotic and potential to prevent diseases in the digestive tract due to bacteriocin content. One of the bacteriocin called plantaricin F, is produced by *Lactobacillus plantarum*. Plantaricin F has antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. The aim of the research was to test the antibacterial activities of several *Lactobacillus* species on 5 bacteria isolates, and analyzed the gene expression of plantaricin F. Seven isolates of ten selected isolates could inhibit the growth of Gram positive and Gram negative bacteria. *Lactobacillus* TB (NK) produced the largest inhibition area of 2.05 cm on *E.coli*, and twice stronger than chloramphenicol control. As confirmation, the plantaricin F gene was analyzed using RT-PCR. The analysis result showed that the size of plantaricin F gene was 70 bp. The highest relative expression of plantaricin F gene was shown by the *Lactobacillus* Mar A2 isolate of 10,676 Au, followed by *Lactobacillus* TB (NK) of 2.9207 Au, and the lowest was *Lactobacillus* TB (CK) of 0.5141 Au. *Lactobacillus* TB (NK) can be used as candidate of probiotic and alternative antibiotic in preventing of gastrointestinal disease.

Keywords: plantaricin F, antimicrobe, *Lactobacillus*, probiotic, tropical fruits.

* Penulis korespondensi, Hp. 08161980768
e-mail: tyulinery@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

INDONESIA kaya akan sumber daya alam, terutama buah - buahan tropis. Banyak penelitian ilmiah yang melaporkan khasiat nyata dari buah yang banyak mengandung vitamin A (beta-karoten), C dan E, magnesium, *zinc*, fosfor, dan asam folat. Buah lokal ini selain nikmat untuk disantap memiliki banyak manfaat bahkan untuk kesehatan, namun sayangnya, masih banyak yang belum dimanfaatkan secara maksimal, dan hanya terbatas untuk pembuatan sirup dan manisan. Untuk itu perlu kontribusi secara signifikan terhadap pertumbuhan produksi dan potensi buah-buah tropis.

Salah satu cara pemanfaatan potensi buah tropis yaitu dengan mengisolasi mikroorganisme yang bermanfaat sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup memberikan manfaat kesehatan pada inangnya, meningkatkan keseimbangan mikroflora usus, sehingga menghambat bakteri patogen, termasuk pengentasan penyakit kronis inflamasi usus, pencegahan dan pengobatan *pathogen-induced diarrhea*, infeksi urogenital dan penyakit atopik⁽¹⁾.

Bakteri asam laktat dan bifido adalah jenis yang paling umum dari mikroba yang digunakan sebagai probiotik⁽²⁾. Probiotik biasanya dikonsumsi sebagai bagian dari makanan fermentasi seperti yogurt, yogurt kedelai, atau sebagai suplemen diet^(3,4).

Lactobacillus termasuk salah satu dari bakteri asam laktat, dapat digunakan sebagai organisme probiotik dan berpotensi mencegah penyakit pada manusia dan hewan, serta mampu menghambat patogen dalam bahan pangan⁽⁵⁾. Peneliti lain mengatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 memiliki potensi yang cukup besar sebagai probiotik⁽⁶⁾.

Lactobacillus dapat diperoleh dari buah-buah tropis seperti buah markisa dan terong belanda yang berasal dari sentra produksi dataran tinggi Karo, Sumatera Utara. Markisa merupakan salah satu jenis buah-buahan yang termasuk keluarga *Passifloraceae*. Buah markisa banyak dibudidayakan di Sumatera Utara dan Sulawesi Selatan yang buahnya diolah menjadi sirup secara komersial⁽⁷⁾ sedangkan terong belanda termasuk famili *Solanaceae*, berbentuk buah buni bulat lonjong dengan meruncing ke ujung, kulitnya halus tipis warna kuning atau merah kusam, daging berair kemerahan atau kuning dengan rasa manis asam. Di daerah tropis terong belanda bisa tumbuh pada ketinggian 1.000 meter dari permukaan laut.

Daya antimikroba dari *Lactobacillus* dapat terjadi karena terbentuknya senyawa-senyawa antimikroba.

Senyawa antimikroba tersebut dapat berupa asam laktat, hidrogen peroksida (H₂O₂), diasetil, karbon dioksida (CO₂) dan bakteriosin⁽⁸⁾.

Bakteri *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan bakteriosin yang dapat berfungsi untuk menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif^(9,10). Bakteriosin yang ditemukan pada bakteri probiotik *L. plantarum* adalah plantaricin. Berbagai jenis plantaricin yang diproduksi oleh *L. plantarum* diantaranya plantaricin (*pln*) A, B, C, D, N, C8, I, F, HK, D, merupakan gen untuk regulasi produksi bakteriosin sedangkan gen plantaricin G, H, S, T, U, V, merupakan gen yang terlibat dalam transportasi bakteriosin^(11,12,13,14).

Peneliti lain mengungkapkan bahwa *L. plantarum* OL15 menghasilkan bakteriosin (plantaricin OL15) yang memberikan efek bakterisidal terhadap bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif⁽¹⁵⁾. Plantaricin memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar dibandingkan bakteriosin dari bakteri asam laktat lainnya. Plantaricin ST26MS (2,8 kDa) dan ST28MS (5,5 kDa) yang diproduksi oleh *L. plantarum* ST26MS dan ST28MS masing-masing dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif seperti *Acinetobacter*, *E. coli* dan *Pseudomonas*. Plantaricin juga memiliki kemampuan menghambat bakteri Gram positif seperti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*⁽¹⁶⁾.

Salah satu plantaricin yang memiliki aktivitas antimikroba pada bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif adalah plantaricin F. Plantaricin ini memiliki kemampuan stabil pada suhu tinggi dan pH yang rendah sehingga dapat dimanfaatkan untuk keperluan fermentasi. Selain itu, mempunyai aktivitas dalam menghambat bakteri yang menyebabkan *foodborne disease*, antara lain *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*⁽¹⁷⁾.

Mekanisme plantaricin F dalam menyerang inangnya adalah dengan cara membuat pori pada membran. Terdapat dua mekanisme utama, yaitu model *barrel stave* dan model *carpet*. Model *barrel stave* memiliki mekanisme yaitu peptida dari bakteriosin berasosiasi dengan membran target, pada saat konsentrasi batas ambang tercapai, peptida yang berasosiasi membuat pori dengan permukaan hidrofobik menghadap keluar dan permukaan hidrofilik menghadap kedalam, pori pada bagian lapisan lipid untuk membantu penembusan, sedangkan model *carpet* memiliki mekanisme dengan peptida dari bakteriosin yang tidak berstruktur membentuk formasi α -heliks saat kontak dengan lingkungan membran target berinteraksi dengan *phospholipid bilayer* kemudian membungkus membran target⁽¹⁸⁾.

Berdasarkan hal di atas maka dilakukan penelitian dengan tujuan menguji aktivitas antibakteri isolat *Lactobacillus* yang berasal dari buah-buahan tropis terhadap bakteri uji dan menganalisis ekspresi gen *plnF*, sehingga dapat menggantikan peran antibiotik untuk menekan pertumbuhan patogen dalam saluran pencernaan.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Buah markisa (*Passiflora edulis*) dan terong belanda (*Solanum betaceum*) yang berasal dari Dataran tinggi Karo, Sumatera Utara. Bakteri uji *E. coli*; *Salmonella thypimurium*; *Pseudomonas floresense* (Gram negatif) dan *S. aureus*; *B. cereus* (Gram positif), media GYP (*Glucose Yeast Peptone*), medium LB (Luria Bertani) untuk pertumbuhan bakteri uji, kalsium asetat, kloroform, fenol, etanol, lisozim 5mg/mL, SDS 10%, kloroform, isopropanol, *diethylpyrocarbonate* (DEPC) 0,1%, etanol 96%, EDTA, primer *plnF* dan 16sRNA *forward dan reverse*, *deoxyribonucleoside triphosphate* (dNTP) mix, RNA Taq mix, 2% gel agarosa, dan *ethidium bromide* (EtBr).

METODE. Isolasi dan karakterisasi bakteri *Lactobacillus*. Isolasi *Lactobacillus* dilakukan dengan menggunakan media GYP dengan komposisi dalam 1 liter sebagai berikut: glukosa 10 g, *yeast extract* 10 g, pepton 5 g, *beef extract* 2 g, Na-asetat.H₂O 1,4 g, *salt solution* 5 ml (*salt solution*: MgSO₄.7H₂O 0,1 g; MnSO₄.4H₂O 0,1 g; FeSO₄.7H₂O 0,1 g; NaCl 0,1 g; dH₂O 50 mL), Tween 80 0,5 g, agar 20 g, CaCO₃ 0,075 g/mL medium, dH₂O 1 L. Media pemeliharaan isolat *Lactobacillus* adalah media MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) agar (Oxoid).

Isolasi dilakukan dengan cara memasukkan 1 g masing-masing sampel buah ke dalam larutan *saline* (0,85% NaCl) secara duplo, kemudian dilakukan pengenceran sampai pada pengenceran 10⁻⁸, lalu diinokulasikan pada media GYP dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Setelah inkubasi diamati pertumbuhannya, apabila pada media GYP terlihat zona jernih diduga bakteri asam laktat. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram dan uji katalase untuk mendapatkan bakteri *Lactobacillus*.

Pewarnaan Gram dilakukan menurut metode Harisha⁽¹⁹⁾ dan uji aktivitas katalase dengan menggunakan H₂O₂ 3%. Apabila diteteskan pada sel bakteri, reaksi katalase negatif apabila tidak ada busa atau buih yang terjadi setelah penambahan larutan tersebut selama 1 menit.

Pembuatan supernatan. Setiap isolat *Lactobacillus* yang telah dikarakterisasi, ditanam dalam medium GYP cair, lalu disentrifugasi dengan

kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit sehingga diperoleh supernatan. Supernatan ini berasal dari suspensi isolat *Lactobacillus* dengan jumlah 108 sel/mL. Supernatan disaring dengan menggunakan membran filter milipore ukuran 0,45 µm untuk menjadi supernatan yang bebas sel.

Uji aktivitas antibakteri *L. Plantarum*. Metode yang digunakan adalah metode *Agar Well Diffusion Assay* (AWDA)⁽²⁰⁾ yang dimodifikasi. Sebanyak 100 µL masing-masing kultur bakteri uji *E. coli*, *S. thypimurium*, *P. floresense* dan *S. aureus*, *B. cereus* disebar di media GYP, lalu diratakan hingga terdispersi keseluruhan permukaan. *Blank disc* yang sudah steril direndam 5 menit di dalam supernatan, kemudian diletakkan pada cawan yang telah berisi medium dan bakteri uji. Kontrol negatif yang digunakan adalah akuades, sedangkan antibiotik kloramfenikol dengan konsentrasi 50 µL digunakan sebagai kontrol positif, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Aktivitas hambatan supernatan terhadap pertumbuhan bakteri uji tampak sebagai zona bening yang terbentuk disekitar *blank disc*. Diukur besar zona hambatan yang terbentuk. Semakin luas zona hambatan maka akan semakin besar aktivitas antibakterinya. Kemudian hasilnya dikoreksi dengan kontrol, yaitu ukuran kertas uji sebesar 0,6 cm.

$$\text{Diameter daerah hambat(ddd) relatif} = \frac{\text{hasil ddd (cm)} - 0,6 \text{ cm}}{0,6 \text{ cm}}$$

Isolasi total RNA *L. Plantarum*. Prosedur isolasi total RNA adalah metode *hot phenol* mengacu kepada metode Sambrook⁽²¹⁾ yang dimodifikasi. Prosedur dimulai dengan pemanenan bakteri, sebanyak 2 mL kultur *L. plantarum* dalam media cair disentrifugasi 7000 rpm selama 5 menit. Pelet yang didapat ditambahkan 1 mL fenol stop (5% fenol jenuh dalam 95% etanol absolut) dan di-*vortex* sampai tercampur. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 800 µL lisozim 5 mg/mL lalu dihomogenkan dengan cara dibolak-balik dan di-*vortex*. Sampel tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Sebanyak 300 µL SDS 10% ditambahkan ke dalam sampel dan dikocok lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 menit. Kemudian ditambahkan 200 µL kalium asetat. Setelah itu, sampel dipanaskan pada suhu 80°C-90°C selama 5 menit langsung dimasukkan ke dalam es selama 3 menit. Sebanyak 80 µL fenol panas ditambahkan dalam sampel dan diinkubasi pada 80°C-90°C selama 5 menit kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 8000 rpm kemudian supernatan diambil dan ditambahkan kloroform dengan perbandingan 1:1 lalu dibolak balik dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama

5 menit sehingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas diambil lalu ditambahkan 500 μ L isopropanol dan dikocok, lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 500 μ L etanol 70% ditambahkan lalu disentrifugasi 8000 rpm selama 5 menit, tahap ini dilakukan dua kali. Pelet dikeringkan lalu dilarutkan dengan 50 μ L DEPC 0,1%.

Hasil yang didapatkan dielektroforesis dengan konsentrasi agarosa 1,5% pada tegangan 100 V selama 30 menit, kemudian hasil elektroforesis RNA total dilihat dengan *Printgraph*.

Pengukuran kualitas dan kuantitas RNA.

Kualitas RNA dapat diukur menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang A260/280 nm. Sampel diencerkan sebanyak 100x dengan air yang telah mendapat perlakuan *Diethylpyrocarbonat* (DEPC). Absorban dibaca pada A260/280 nm.

Amplifikasi gen *plnF* dengan RT-PCR.

Amplifikasi gen *pln* dengan RT-PCR dilakukan berdasarkan metode dari Invitrogen⁽²²⁾. Metode dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan dari *SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq Invitrogen*. *Master mix* dibuat dengan penambahan 12,5 μ L *2x Reaction Mix*, 1 μ L *Primer Reverse*, 1 μ L *Primer Forward*, 1 μ L *Taq mix*, 9,5 μ L ddH₂O steril, dan 1 μ L *template RNA*. Campuran tersebut di-*spin* selama 1 menit supaya tercampur dengan sempurna kemudian dimasukkan ke dalam mesin *PCR Gradient (Polymerase Chain Reaction)*. Reaksi *reverse transcriptase* dimulai dengan program 1 siklus 55°C selama 30 menit, 1 siklus 94°C selama 4 menit, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi PCR sebanyak 40 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, *extention* pada 72°C selama 1 menit, dan *final extension* sebanyak 1 siklus pada suhu 72°C selama 7 menit, dan 1 siklus 4°C. Hasil PCR tersebut dilanjutkan dengan elektroforesis untuk melihat produk yang terbentuk. Hasil dari *printgraph*

kemudian dihitung densitasnya dengan menggunakan *CS Analyzer*.

Analisis ekspresi gen *plnF*⁽²³⁾. Pengukuran ekspresi gen *plnF* menggunakan software *CS Analyzer*. Cara kerja *CS Analyzer* adalah setelah dilakukan analisis elektroforesis gel agarosa, data hasil elektroforesis berupa gambar di-*scan* dan diubah menjadi data digital untuk mencari data yang diperlukan. Proses perhitungan dimulai dengan menghitung 1 μ L RNA dari RNA total dan RNA produk yang dielektroforesis dari hasil *CS Analyzer*. Hasil yang didapatkan akan menghasilkan ekspresi gen dari plantaricin F dan 16S rRNA. Hasil perhitungan dari ekspresi gen *plnF* dan 16S rRNA dapat menjelaskan ekspresi relatif gen *plnF* yang terdapat pada masing-masing isolat.

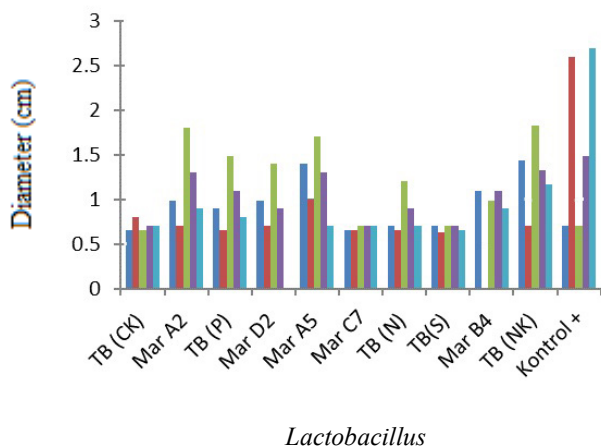
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan terhadap semua koloni bakteri yang diisolasi dari buah markisa dan terong belanda (Tabel 1), koloni bakteri asam laktat ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloninya. Adanya zona bening tersebut akibat bakteri tersebut memproduksi asam yang menetralkan CaCO₃ yang terdapat pada media selama pertumbuhan bakteri asam laktat. Dari hasil isolasi diperoleh 10 isolat, ternyata semua isolat berbentuk batang (*Rod*) dan termasuk ke dalam bakteri Gram positif (positif), reaksi katalase tidak mengeluarkan buih setelah diberi H₂O₂, hal ini tidak menunjukkan aktivitas katalase (negatif). Semua bakteri asam laktat di atas merupakan biak *Lactobacillus*. Bakteri asam laktat terdiri dari genus *Lactobacillus*; *Streptococcus*; *Leuconostoc*; *Pediococcus*, genus-genus tersebut selain *Lactobacillus*, selnya berbentuk *coccus*⁽²⁴⁾.

Uji aktivitas antibakteri *L. plantarum* terhadap bakteri uji. Sepuluh isolat pengujian aktivitas *L. plantarum* yakni TB (CK), Mar A2, TB (P), Mar D2,

Tabel 1. Morfologi dan fisiologi bakteri *Lactobacillus*.

| Kode biak | Asal | Gram | Bentuk sel | Reaksi katalase |
|-----------|----------------|------|------------|-----------------|
| Mar A5 | Markisa | + | Batang | – |
| Mar C7 | Markisa | + | Batang | – |
| Mar B4 | Markisa | + | Batang | – |
| Mar D2 | Markisa | + | Batang | – |
| Mar A2 | Markisa | + | Batang | – |
| TB (N) | Terong belanda | + | Batang | – |
| TB (S) | Terong belanda | + | Batang | – |
| TB (CK) | Terong belanda | + | Batang | – |
| TB (NK) | Terong belanda | + | Batang | – |
| TB (P) | Terong belanda | + | Batang | – |



Lactobacillus

Gambar 1. Diameter daerah hambat *Lactobacillus* terhadap bakteri uji, biru tua: *S. typhimurium*, merah: *S. aureus*, hijau: *E. coli*, ungu: *P. floresense*, biru muda: *B. cereus*.

Mar A5, Mar C7, TB (N), TB (S), Mar B4, TB (NK) yang digunakan menghasilkan daya penghambatan yang berbeda-beda (Gambar 1). Hasil uji aktivitas didapatkan delapan isolat *Lactobacillus* terbaik yaitu TB (CK), Mar A2, TB (P), Mar D2, Mar A5, TB (N), Mar B4, TB (NK) dan delapan isolat ini memiliki spektrum yang luas yaitu mampu menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Hal ini sesuai dengan Gong *et al.*⁽²⁰⁾ yang menyatakan bahwa *L. plantarum* dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif seperti *B. cereus* dan *S. aureus* serta juga dapat menghambat bakteri Gram negatif seperti *E. coli*, *P. floresense* dan *S. typhimurium*.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa 2 isolat *Lactobacillus* yang hampir tidak dapat menghambat bakteri uji yakni Mar C7 dan TB (S). Penghambatan ini termasuk kategori aktifitas antibakteri yang sangat lemah. Berdasarkan metode David Stout, aktivitas antibakteri terbagi menjadi daerah hambat sebesar <5 mm (lemah); diameter 5-10 mm (sedang); diameter 10-20 mm termasuk sebagai antibakteri yang kuat; dan >20 mm termasuk antibakteri yang sangat kuat⁽²⁵⁾.

Isolat *Lactobacillus* yang memiliki penghambatan paling besar terhadap semua bakteri uji adalah isolat TB (NK). Penghambatan terhadap bakteri *S. typhimurium* sebesar 1,5 cm, apabila dibandingkan dengan kontrol positif dapat menghambat 2 kali lebih luas dari kloramfenikol dimana kloramfenikol memiliki daya hambat sebesar 0,7 cm. Sedangkan terhadap bakteri uji *E. coli* sebesar 2,05 cm dan dapat menghambat kloramfenikol sebesar 2,6 kalinya. Demikian juga terhadap bakteri uji *P. floresense* hampir sama penghambatannya dengan kontrol yakni 1,33 cm. Uji aktivitas dari *Lactobacillus* menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol karena merupakan antibiotik yang berspektrum luas dan aktif dalam menghambat bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Kloramfenikol dalam menghambat bakteri adalah dengan bergabung bersama subunit-subunit ribosom sehingga mengganggu sintesis protein⁽²⁶⁾.

Isolat Mar A5 dan Mar A2 juga menghambat *P. floresense* dengan diameter daerah hambat yang sama yakni 1,3 cm kecuali untuk bakteri Gram positif *S. aureus* paling baik dihambat oleh isolat Mar A5 dengan tingkat penghambatan relatif sebesar 0,667 cm. *B. cereus* paling baik dihambat oleh isolat TB (NK) dengan tingkat penghambatan sebesar 0,95 cm (Tabel 2 dan Tabel 3).

Bakteri patogen yang tidak terlalu berpengaruh nilai penghambatan relatifnya adalah *S. aureus* yaitu dengan nilai rata-rata sebesar 0,667 cm (Tabel 3). *S. aureus* merupakan bakteri yang paling sulit dihambat oleh *L. plantarum* tersebut, hal ini karena *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki dinding peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri Gram negatif, sehingga bakteriosin dalam hal ini plantaricin tidak dapat bekerja secara efektif dalam lisis membran sel *S. aureus* tersebut. Aktivitas bakteriosin ini terbatas pada bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengan bakteri penghasil. Daya antimikrobal terhadap bakteri target ini dipengaruhi

Tabel 2. Diameter daerah hambat beberapa *Lactobacillus* terhadap bakteri uji (cm).

| <i>Lactobacillus</i> | Zona Inhibisi bakteri uji (cm) | | | | |
|----------------------|--------------------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|
| | <i>S. typhimurium</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. floresense</i> | <i>B. cereus</i> |
| Mar A5 | 1,4 | 1 | 1,7 | 1,3 | 0,7 |
| Mar C7 | 0,65 | 0,65 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| TB (N) | 0,7 | 0,65 | 1,2 | 0,9 | 0,7 |
| TB (S) | 0,7 | 0,63 | 0,7 | 0,7 | 0,65 |
| Mar B4 | 1,1 | 0 | 1 | 1,1 | 0,9 |
| TB (CK) | 0,65 | 0,80 | 0,65 | 0,70 | 0,70 |
| TB (NK) | 1,50 | 0,17 | 1,83 | 1,33 | 1,17 |
| Mar A2 | 1,00 | 0,70 | 1,80 | 1,30 | 0,90 |
| Mar D2 | 1,00 | 0,70 | 1,40 | 0,90 | 0 |
| TB (P) | 0,90 | 0,65 | 1,50 | 1,10 | 0,80 |
| Kontrol + | 0,70 | 2,6 | 0,70 | 1,50 | 2,70 |

Tabel 3. Tingkat penghambatan relatif isolat *L. plantarum* terhadap bakteri uji.

| <i>Lactobacillus</i> | Zona Inhibisi bakteri uji (cm) | | | | |
|----------------------|--------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------|------------------|
| | <i>S.thyphirium</i> | <i>S.aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. flouresense</i> | <i>B. cereus</i> |
| Mar A5 | 1,33 | 0,667 | 1,83 | 1,166 | 0,166 |
| Mar C7 | 0,083 | 0,083 | 0,166 | 0,166 | 0,166 |
| TB (N) | 0,166 | 0,083 | 1,00 | 0,50 | 0,166 |
| TB (S) | 0,166 | 0,05 | 0,166 | 0,166 | 0,083 |
| Mar B4 | 0,833 | 0,00 | 0,667 | 0,833 | 0,50 |
| TB (CK) | 0,083 | 0,33 | 0,083 | 0,166 | 0,166 |
| TB (NK) | 1,5 | 0,17 | 2,05 | 1,21 | 0,95 |
| Mar A2 | 0,667 | 0,166 | 2,00 | 1,166 | 0,50 |
| Mar D2 | 0,667 | 0,166 | 1,33 | 0,5 | 0 |
| TB (P) | 0,5 | 0,083 | 1,50 | 0,833 | 0,33 |

oleh reseptor khusus bakteriosin dan sensitifitas sel target⁽²⁷⁾, namun penelitian lain menunjukkan bakteriosin dari *L. plantarum* tidak menghambat *S. aureus* sedangkan bakteriosin dari *L. acidophilus* menghambat bakteri Gram negatif⁽²⁸⁾.

Nilai tingkat penghambatan patogen relatif yang paling tinggi adalah patogen *E. coli* yaitu dengan nilai rata-rata sebesar 2,05 cm. Nilai penghambatan relatif yang tinggi menyatakan bahwa *E. coli* merupakan bakteri patogen yang paling mudah dihambat oleh isolat *L. plantarum* tersebut, hal ini disebabkan karena *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki dinding peptidoglikan yang tipis, sehingga bakteriosin yang terdapat dalam isolat *L. plantarum* dapat bekerja lebih efektif dalam lisis membran *E. coli* tersebut.

Escherichia adalah bakteri Gram negatif yang sebagian spesiesnya penyebab penyakit saluran pencernaan. *E. coli* merupakan patogen saluran pencernaan yang menjadi penyebab utama diare. Dengan adanya aktivitas antibakteri *L. plantarum* maka akan menekan pertumbuhan *E. coli* penyebab diare tersebut. *L. plantarum* memiliki mekanisme kerja untuk menurunkan jumlah bakteri patogen, melakukan kompetisi untuk memperoleh daerah kolonisasi. Beberapa galur *E. coli* ditemukan patogen dalam usus manusia dan hewan yang terlibat dalam penyakit menular melalui makanan. Bakteri Gram positif lainnya yang merupakan mikroba penyebab pembusukan dan patogen makanan yaitu *Staphylococcus aureus* dan beberapa spesies *Bacillus*. *Salmonella* sp. yang menyebabkan penyakit terutama adalah *Salmonella typhimurium* yang ditemukan dalam usus manusia, burung dan serangga⁽²⁹⁾.

Hasil isolasi total RNA *Lactobacillus*. Setelah pengujian aktivitas antibakteri, didapatkan delapan isolat *L. plantarum* dengan aktivitas antibakteri terbaik. Isolasi RNA dilakukan dengan metode dari Sambrook⁽²¹⁾ yang telah dimodifikasi, kemudian RNA yang didapat di ukur kuantitas dan kualitas RNA menggunakan spektrofotometer pada A260/280. Pengukuran pada panjang gelombang 260 nm

untuk mengukur asam nukleat, sedangkan absorbansi dengan panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengukur protein⁽³⁰⁾. Rasio pengukuran absorbansi tersebut digunakan untuk menunjukkan kemurnian RNA terhadap kontaminasi protein. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.

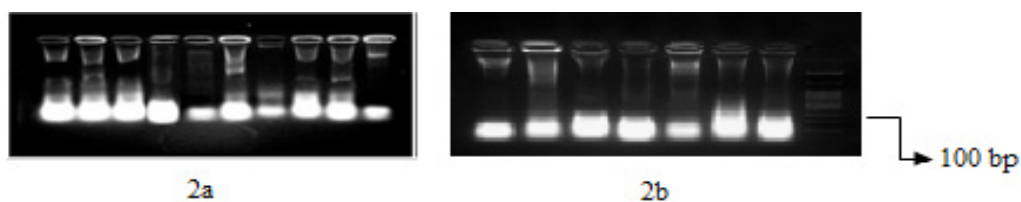
Hasil pengukuran kuantitas RNA menunjukkan bahwa sampel yang diisolasi tidak memiliki kemurnian yang tinggi terhadap kontaminasi dari protein atau pengotor lain. Kontaminasi protein atau pengotor lain dapat terjadi pada saat ekstraksi dengan kloroform sehingga tidak efisien dalam menghilangkan protein ataupun pengotor lain. Nilai yang diharapkan dari pengukuran ini berkisar 1,8-2,1⁽²¹⁾. Sedangkan jumlah kuantitas RNA sangat mencukupi untuk amplifikasi, kecuali isolat Mar D2 tidak memenuhi kuantitas RNA (data tidak ditampilkan).

Selanjutnya setelah diukur total RNA *Lactobacillus*, kemudian dianalisa dengan elektroforesis menggunakan agarosa 1,5 %, untuk melihat ada atau tidaknya RNA. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Amplifikasi gen *plnF* dengan RT-PCR. Delapan isolat *Lactobacillus* yang mempunyai daya hambat terhadap bakteri Gram positif dan negatif kemudian dilakukan konfirmasi dengan RT-PCR untuk menganalisis gen plantarisin F tersebut terekspresi. Primer yang digunakan yaitu 16S rRNA (sebagai kontrol) dan *plnF*. Primer *plnF* dirancang memiliki sekuens *forward* 5'-TTC CAT GCC TAT AGC GCG CGT-3' dengan dan *reverse* 5'-TGA TCC AAT CGG

Tabel 4. Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas RNA masing-masing *Lactobacillus*.

| Isolat <i>Lactobacillus</i> | Kuantitas RNA (ug/ μ L) | Kualitas RNA A260/A280 |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| TB (CK) | 11336 | 1,0125 |
| Mar A5 | 11840 | 1,132 |
| TB (NK) | 11196 | 0,9605 |
| TB (N) | 11488 | 0,9856 |
| Mar A2 | 4712 | 1,1230 |
| TB (P) | 11336 | 1,0755 |
| Mar B4 | 4796 | 1,1408 |



Gambar 2. Hasil elektroforesis RNA total isolat *L. plantarum*. 2a: 1=TB(CK), 4=TB(N), 7=TB(S), 10= Mar B4, M=Marker. 2b: 1= Mar A5, 3= TB(NK), 5= Mar A2, 7= TB(P).

CAG GCC CAA-3'. Ukuran produk dari primer 16S rRNA primer universal sebesar ± 194 bp, dan *plnF* sebesar ± 69 bp.

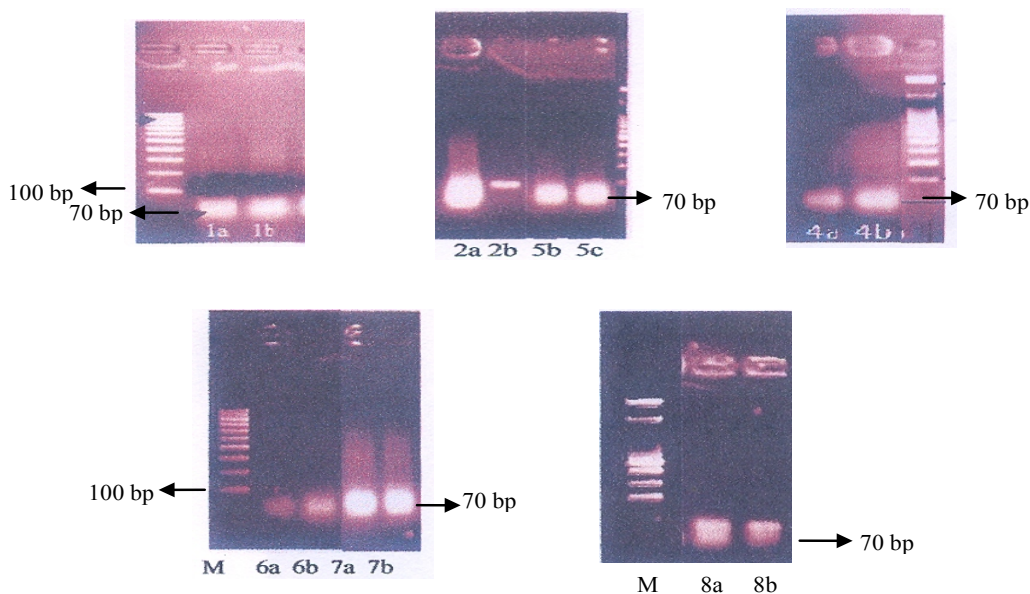
Penggunaan primer 16S rRNA bertujuan sebagai kontrol positif dalam proses PCR. Hal ini karena 16S rRNA terdapat di semua bakteri sehingga diasumsikan semua RNA isolat yang dianalisa dapat mengekspresikan gen 16S rRNA. Ekspresi gen 16S rRNA dapat dijadikan kontrol untuk ekspresi gen plantarisin yang akan dianalisa. Setelah diamplifikasi kemudian di elektroforesis. Hasil elektroforesis dianalisis dengan *CS analyzer*. Dari densitas tersebut dapat diketahui konsentrasi RNA yang dihasilkan oleh produk. Hasil elektroforesis dari produk PCR dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 terlihat produk hasil amplifikasi PCR yang menunjukkan ekspresi gen dari masing-masing isolat *Lactobacillus*. Pita-pita hasil elektroforesis dengan gel agarosa 1,5% menunjukkan pita DNA berukuran 70 bp. Produk hasil PCR yang berukuran ± 70 bp masih berada dalam rentang produk primer yang digunakan, sehingga dapat dinyatakan produk PCR tersebut merupakan produk dari primer

yang teramplifikasi, dan gen tersebut merupakan gen *plnF* yang diinginkan (notasi a pada Gambar 3). Isolat tersebut merupakan *Lactobacillus plantarum* karena mempunyai gen plantarisin. Isolat *Lactobacillus* yang diuji mempunyai gen plantarisin F sehingga dapat menghambat kelima bakteri uji. Hal ini sesuai dengan hasil sebelumnya⁽³¹⁾ yang menyatakan bahwa isolat yang mengandung plantaricin F dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Untuk dapat menentukan nilai ekspresi gen yang ada pada tiap isolat *Lactobacillus*, nilai ekspresi gen *plnF* dan 16S rRNA dianalisis menggunakan program *CS Analyzer*. Ekspresi gen merupakan proses yang membawa keterangan mengenai satu gen atau lebih gen ke dalam data fenotip, dalam proses ini melibatkan transkripsi dan translasi⁽³²⁾. Hasil ekspresi gen didapatkan dari elektroforesis RNA total dengan produk hasil RT-PCR (Tabel 5).

Nilai ekspresi gen *plnF* yang dihasilkan oleh tujuh isolat *L. plantarum* memiliki nilai berbeda-beda dengan satuan ekspresi *Arbitrary Unit* (Au). Nilai ekspresi relatif gen *plnF* paling tinggi ditunjukkan oleh isolat Mar A2 dengan nilai 10,676 Au, diikuti



Gambar 3. Ekspresi gen *plnF* dan 16S rRNA isolat *Lactobacillus* dengan RT-PCR. Keterangan: Isolat 1. Mar A5; 2. Mar A2; 4.TB(N); 5. TB(P); 6. TB(CK); 7. TB(NK); 8. Mar B4; a. *plnF*; b. 16S rRNA.

Tabel 5. Ekspresi gen *plnF* dan gen 16S rRNA.

| Isolat <i>Lactobacillus</i> | RNA Total | Ekspresi relatif gen | |
|-----------------------------|-----------|----------------------|-------------|
| | | Plantaricin F(Au) | 16sRNA (Au) |
| Mar A5 | 29734,6 | 0,93 | 0,9275 |
| Mar B4 | 19322,8 | 1,37 | 1,3657 |
| Mar A2 | 60043,2 | 10,676 | 0,4733 |
| TB (N) | 10596,8 | 1,18 | 1,1776 |
| TB(CK) | 75280,8 | 0,5141 | 2,5292 |
| TB(NK) | 79604,0 | 2,9207 | 4,1656 |
| TB(P) | 83092,8 | 2,6389 | 0,7327 |

oleh isolat TB (NK) dengan nilai 2,9207 Au, sedangkan isolat TB (CK) memiliki nilai ekspresi relatif gen *plnF* paling rendah yakni sebesar 0,5141 Au.

Antibiotik yang diproduksi oleh bakteri merupakan metabolit sekunder yang disintesis selama fase stasioner dalam pertumbuhan bakteri. Bakteriosin diproduksi selama fase stasioner dalam pertumbuhan bakteri asam laktat seperti Plantaricin F, Pediocin N5p. Pada produksi bakteriosin Pediocin PD-1 disintesis selama fase eksponensial dan dicapai produksi maksimum pada fase stasioner⁽³³⁾.

SIMPULAN

Dari sepuluh isolat *Lactobacillus* terpilih, delapan isolat mampu menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Isolat TB (NK) memiliki penghambatan paling besar dibandingkan isolat *Lactobacillus* lainnya yakni 2,05 cm terhadap *E. coli* dan menghambat 2 kali lebih besar dari pada kontrolnya (kloramfenikol). Tujuh isolat *Lactobacillus* dapat mengekspresikan gen *plnF* dengan ukuran produk ± 70 pb. Nilai ekspresi relatif gen *plnF* paling tinggi ditunjukkan oleh isolat Mar A2 dengan nilai 10,676 Au, diikuti oleh isolat TB (NK) dengan nilai 2,9207 Au. Isolat TB (NK) dapat dijadikan kandidat sebagai probiotik yang dapat dijadikan alternatif pengganti antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* mencegah penyakit saluran pencernaan

DAFTAR PUSTAKA

- Ogueke CC, Owuamanam CI, Ihediohanna NC, Iwouno JO. Probiotics and prebiotics: unfolding prospects for better human health. Pakistan Journal of Nutrition. 2010. 9(9):833-43.
- Endaryanto A dan Harsono A. 2005; [1 tayangan]. diambil dari URL: <http://old.pediatrik.com/buletin/06224114052-ubg9tv.pdf>. diakses 29 Januari, 2011.
- Savado AC, Ouara AT, Bassole IH, Traore AS. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. Afr J Biotechnol. 2006. 5(9):678-83.
- Food and Agriculture Organization and World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of Joint FAO/WHO Working Group on drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. 1-11.
- Ljungn Å and Wadström T. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. Lund: Caister Academic Press; 2009. 205.
- Vizoso Pinto MG, Schuster T, Briviba K, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. Journal of Food Protection. 2007. 70(1):125–34.
- Anonymous. Pasca Panen Markisa. Sukarami: Departemen Pertanian Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP); 1998. 49.
- Barefoot SF and Nettles CG. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. J Dairy Sci. 1993. 76(8):2366-79.
- James R, C Lazdunski, F Pattus. Bacteriocins, microcins and lantibiotics. Berlin, Heidelberg: Spinger-Verlag; 1992. 519.
- Daeschel MA. Application and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. New York: Academic Press Inc; 1993. 63-91.
- Sturme MHJ, Francke C, Sizen RJ, de Vos W, Kleerebezem M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Microbiology. 2007. 153(12):3939–47.
- Rojo-Bezarez B, Sáenz Y, Navarro L, Jiménez-Días R, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, et al. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape origin. Archives in Microbiology. 2008. 189(5):491–9.
- Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C, Nes IF. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. Peptides. 2009. 30(8):1562–74.
- Sáenz Y, Rojo-Bezarez B, Navarro L, Díez L, Somalo S, Zarazaga M, et al. Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. International Journal of Microbiology. 2009. 134(3):176–83.
- Kacem M, Zadi-Karam H, Karam N. Detection and activity of plantaricin OL15 a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Algerian fermented olives. Grasas Aceites. 2005. 56(3):192-7.
- Todorov S, Manuela V, Paul G. Comparison of

- two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus Plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004. 35(1-2):157-60.
17. Paynter MJB, Brown KA, Hayasaka SS. Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001. *Letter in Applied Microbiology*. 1997. 24(3):159-65.
 18. Jørgenrud BM. Construction of a heterologous expression vector for plantaricin F, one of the peptides constituting the two-peptide bacteriocin plantaricin EF [thesis]. Oslo: University of Oslo; 2009. 99.
 19. Harisha S. An introduction to practical biotechnology. New Delhi: Laxmi Publications; 2006. 172.
 20. Gong HS, Meng XC, Wang H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Elsevier, Food Control*. 2010. 21:89-96.
 21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 545.
 22. Invitrogen. SuperScript III one-step RT-PCR system with platinum taq DNA polymerase. California: Life Technology; 2007.
 23. Nurhidayat N. Laporan akhir kumulatif kegiatan program kompetitif: domestika bakteri probiotik dari buah-buahan untuk immunomodulator penunjang ketahanan pangan fungsional. Bogor: LIPI Cibinong; 2010. 1-58.
 24. Anguirre M and Colins M. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol*. 1993. 75:95-107.
 25. Yani A. Fraksinasi komponen aktif antibakteri ekstrak kulit batang tanaman berenuk (*Crescentia cujete* L.) [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor; 2011. 8.
 26. Pelczar MJ dan Chan ECS. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Pr.; 2005. 5-190.
 27. Siegers K and Entian KD. Genes involved in immunity to the latibiotic nisin produced by *L. lactis* 6F3. *App and Env Microbiology*. 1995. 61(3):1082-9.
 28. Larsen AG, Vogensen FK, Josephsen J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993. 75(2):113-22.
 29. Lindgren SE and Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev*. 1990. 7(1-2):149-63.
 30. Ray B. *Fundamental food microbiology*. Tokyo: CRS Press; 1996. 8-29.
 31. Song H, Liu Y, Hu G, Qin Y, Lin S. An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat (*Eriobotrya Japonica* Lindl.) *Buds. Pak J Bot*. 2011. 43(2):1163-71.
 32. Smith AD, Datta SP, Smith GH, Campbell PN, Bently R, Mc Kenzie AH, *et al*. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford: Oxford University Pr. Inc.; 2000. 719.
 33. Navarro L, Zarazaga M, Saenz J, Ruiz-Larrea F, Torres C. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*. 2000. 88(1):44-55.