

## Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A dari Kolon Sapi Bali sebagai Probiotik melalui Analisis Gen 16S rRNA

*(Studies on Lactic Acid Bacteria Isolate 9A from Bali Cattle' Colon as a Probiotic Through 16S rRNA Gene Analysis)*

Dewa Gede Agung Widyadnyana<sup>1</sup>, I Dewa Made Sukrama<sup>2</sup>, I Wayan Suardana<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Hewan; <sup>2</sup> Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran;

<sup>3</sup>Laboratorium Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

<sup>\*</sup>Corresponding author: wayan\_suardana@unud.ac.id

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) is a bacterium that ferment lactose to produce lactic acid as the main product. Moreover, LAB also known potentially producing bacteriosins which has antimicrobial activity. On the other hands, Bali cattle has many advantages, one of them is their adaptation to survive in less nutritious food. Their characteristics were believed as a source of potential LAB. The aims of study was to discover the antimicrobial activity of LAB isolate 9A isolated from colon of bali cattle, so that it can be used as a probiotic, and to analyze the nucleotides sequences of 16S rRNA gene as well as their's phylogenetic tree. The LAB isolates were cultivated on MRS broth, followed by catalase test and stained with Gram staining. The antimicrobial activity was confirmed by testing them against pathogen bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). The molecular analyses in order to confirm the strain of isolate was done by amplification of the 16S rRNA gene by using B27F and U1492R primers... The result of study showed antimicrobial activity of LAB isolate 9A against the growth of *S.aureus* is 37.56 – 61.47% with an average 50.35% compared antibiotic control. On the other hands, the isolate showed no antimicrobial activity to *Escherichia coli*. The isolate was identified as *Streptococcus bovis* (99% similarity with bootstrap value 100).

**Keywords:** Lactic acid bacteria, bali cattle's colon, antimicrobial activity, 16S rRNA gene.

### ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang mampu memfermentasi laktosa dan menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya. BAL berpotensi dalam memproduksi bakteriosin dan bersifat probiotik. Disisi lain, sapi bali diketahui memiliki banyak keunggulan salah satunya mampu memanfaatkan hijauan yang kurang bergizi, dan mempunyai daya cerna yang baik terhadap pakan, sehingga diharapkan dapat ditemukan BAL yang memiliki keunggulan spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk dapat mengetahui aktivitas antimikroba BAL isolat 9A asal kolon sapi bali sehingga bisa di manfaatkan sebagai kandidat probiotik, serta untuk menganalisis susunan nukleotida dan gambaran pohon filogenetiknya. Penelitian diawali dengan kultivasi isolat pada media MRS broth, dilanjutkan dengan uji katalase dan pewarnaan Gram. Isolat BAL yang sudah terkonfirmasi diuji aktivitas antimikrobanya dengan bakteri patogen (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*). Analisis molekuler dilakukan dengan amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer B27F dan U1492R. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antimikroba bakteri asam laktat isolat 9A mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* antara 37,56 - 61,47%, dengan rata-rata 50.35% jika dibandingkan dengan kontrol antibiotika. Dalam penelitian ini BAL tidak menunjukkan terjadinya penghambatan pada pertumbuhan *E. Coli*. BAL isolat 9A teridentifikasi sebagai *Streptococcus bovis* dengan tingkat similaritas 99% dan berada satu cluster dengan spesies *Streptococcus bovis* dengan nilai bootstrap sebesar 100.

**Kata kunci:** Bakteri asam laktat, kolon sapi bali, aktivitas antimikroba, gen 16S rRNA

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk basil atau kokus, fakultatif anaerob dan mampu memfermentasi laktosa dengan asam laktat sebagai hasil utamanya. Peranan penting BAL adalah memecah protein menjadi mono-peptida asam amino tersedia bagi tubuh serta menghasilkan bakteriosin (Widodo, 2003). Bakteriosin memiliki peranan dalam menanggulangi kejadian infeksi, aman dan tidak menimbulkan resistensi (Marshall dan Arenas, 2003)

Sapi bali yang merupakan sapi asli Indonesia, merupakan hasil domestikasi banteng (*Bos (Bibos) banteng*) (Batan, 2006) dengan keunggulannya mudah beradaptasi dengan lingkungannya, serta dapat hidup di lahan kritis karena dapat memanfaatkan hijauan yang kurang bergizi, dan mempunyai daya cerna yang baik terhadap pakan (Hardjosubroto, 1994). Diketahui bahwa pakan memberikan pengaruh terhadap ekologi dari bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan (Suardana dan Suarsana, 2007). Disisi lain, saluran pencernaan hewan (sapi) diketahui memiliki sejumlah besar mikroorganisme, pada usus besar atau kolon dengan 400-500 jenis bakteri, dan jumlahnya dapat mencapai ( $10^{12}$ - $10^{14}$ ) sel. Pada kolon, bakteri asam laktat (BAL) umumnya ditemukan sekitar  $10^4$ - $10^9$  bakteri per gram isi kolon (Lambert and Hull, 1996), sehingga menjadikan upaya identifikasi BAL pada saluran cerna sapi bali menarik untuk dilakukan.

Upaya identifikasi spesies bakteri asam laktat dapat dilakukan melalui pemeriksaan karakteristik morfologi, metabolit, fenotipik dan genotipik. Metode fenotipik dianggap kurang efisien dan kurang akurat karena mengandalkan ekspresi fenotip di bawah kondisi laboratorium dan dapat

menyebabkan kesalahan identifikasi (*misidentification*) (Chenool et al., 2003). Metode genotipik yang banyak diaplikasikan dalam studi identifikasi mikrobial adalah menggunakan analisis skuen gen 16S dan 23S rRNA (Anindita, 2013).

Isolat bakteri asam laktat (BAL) 9A merupakan bakteri asam laktat hasil isolasi 20 sampel feses yang berasal dari kolon sapi bali yang sudah terkonfirmasi sebagai BAL didasarkan atas uji penumbuhan pada MRS, uji katalase, pewarnaan Gram dan diketahui memiliki potensi antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri patogen (Lindawati dan Suardana, 2014), namun sejauh ini konfirmasi akurat tentang potensi serta analisis secara genetik dengan analisis gen 16S rRNA belum pernah dilakukan. Berdasarkan uraian tersebut, maka kajian ini menarik untuk disajikan sehingga nantinya dapat memperkuat kriteria penilaian sebagai kandidat probiotik unggul.

## Materi dan Metode

### Kultivasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A

Isolat bakteri asam laktat (BAL) 9A merupakan BAL hasil penelitian sebelumnya (Lindawati dan Suardana, 2014), tersimpan dalam bentuk stok freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Penumbuhan isolat BAL 9A di mulai dengan melakukan *thawing* pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Selanjutnya di biakan dalam *de Mann Rogosa Sharp* (MRS) broth dan dinkubasikan selama 24 jam  $37^{\circ}\text{C}$  pada kondisi *anaerob* (0,5%  $\text{CaCO}_3$ ) dengan menambahkan *gas generating kit* sebanyak 2 *sachet* pada *anaerobic jar*. Bakteri diuji katalase dengan diambil satu tetes kultur isolat selanjutnya di tetesi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan konsentrasi 10% dan diamati adanya gelembung gas yang terbentuk. Bakteri pada uji katalase negatif selanjutnya dibuat sediaan apus pada objek gelas

dengan pewarnaan Gram dan diamati di bawah mikroskop.

### Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Isolat 9A

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menginokulasi biakan dari *stock culture* ke dalam 5 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 48 jam dalam suasana anaerob. Selanjutnya diinokulasikan satu ose biakan murni bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus* ke dalam 5 mL medium *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi biakan ditanam dengan metode sebar sebanyak 100 µL di atas medium *Mueller Hinton* (MH). Setelah kering, pada medium dibuat sumur-sumur dengan diameter 5-6 mm, kemudian bakteri asam laktat yang telah ditumbuhkan sebelumnya masing-masing didepositkan sebanyak 20 µL pada sumur-sumur tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat yang terbentuk diukur sebanyak tiga kali kemudian hasilnya dirata-ratakan dan dikurangi dengan diameter sumur (*well*) dari antibiotika kontrol (Sujaya *et al.*, 2008). Persentase penghambatan BAL dalam menghambat patogen dihitung dengan pembandingan antibiotik *chloramphenicol* menggunakan rumus Tangapo (2006).

### Analisis Molekuler

Isolasi DNA genom dilakukan sesuai dengan prosedur Kit Qiagen, 2007. Metode PCR dilakukan dengan menggunakan primer universal oligonukleotida B27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTACG-3' dan U1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' seperti yang digunakan oleh Lim *et al.* (2009). Setiap sampel DNA diencerkan dengan aquabides dengan

perbandingan 1 : 4 yaitu 1 µl DNA genom diencerkan dengan 4 µl aquabides. Satu mikroliter (1 µl) DNA genom dimasukkan ke dalam tabung PCR kemudian ditambahkan 25 µl *dream taq green*, 1 µl *forward primer* B27F (10 pmol), 1 µl *reverse primer* U1492R (10 pmol) dan 10 µl aquabides sehingga volume total 38 µl. Reaksi PCR menggunakan suhu denaturasi tunggal 94°C selama 7 menit yang diikuti 35 siklus yang terdiri dari denaturasi dengan suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* dengan suhu 56°C selama 1 menit, dan *extension* dengan suhu 72°C selama 1,5 menit. Satu tahap perpanjangan tahapan pada akhir siklus dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk PCR kemudian dielektroforesis dengan *agarose gel* 1,5%.

### Analisis Data

Produk PCR yang positif kemudian di sekuensing. Data susunan nukleotida gen 16S rRNA di *alignment* dan di baca homologinya di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan menggunakan "*clustal W program package*" untuk menentukan pohon filogenetik untuk melihat hubungan kekerabatan isolat, di buat berdasarkan pendekatan *neighbor-joining method* dalam program MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

## Hasil dan Pembahasan

### Kultivasi Bakteri Asam Laktat Isolat 9A

Bakteri asam laktat (BAL) 9A tumbuh pada media MRS *broth*, bersifat katalase negatif, dan Gram positif (+) dengan morfologi *coccus*. Widodo (2003) menyebutkan hampir semua strain BAL tidak menghasilkan enzim katalase, sehingga pada pengujian hasilnya negatif sebagai akibat tidak terjadinya degradasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh enzim katalase.

Peptidoglikan pada dinding sel bakteri ini membuat bakteri Gram positif resisten terhadap lisis osmotik. Pada pewarnaan Gram, bakteri ini memiliki tampilan berwarna ungu (Jawetz *et al.*, 2001).

**Uji Aktivitas Antimikroba**

Pengujian aktivitas antimikroba spesies BAL

isolat 9A hanya menunjukkan diameter zona hambatannya terhadap bakteri indikator *S. Aureus*. dengan zona hambat yang berkisar 0,77-1,26 cm atau memiliki kemampuan menghambat sebesar 6,15 - 7,56 % dibandingkan kontrol antibiotika control dengan zona hambat 2,12 cm, namun tidak memperlihatkan daya hambat terhadap *E. coli*

Tabel 1. Uji daya hambat BAL isolat 9A terhadap bakteri patogen

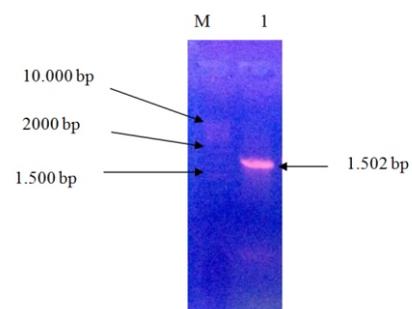
Ulangan	Diameter Zona Hambat (cm)			
	<i>S. aureus</i>	Efektifitas penghambatan %	<i>E. coli</i>	Efektifitas penghambatan %
1	1.26	61.47	0	0
2	0.97	47.3	0	0
3	1.13	55.1	0	0
4	0.77	37.56	0	0
Rata-rata	1.03±0,21	50.35	0	0

\*) Nilai-nilai pada Tabel 1. standar deviasi rata-rata dari empat kali ulangan

Dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, bakteri asam laktat tidak hanya menghasilkan asam laktat dan asam asetat (asam organik), tetapi juga senyawa-senyawa lain seperti bakteriosin yang memiliki aktivitas antibakteri (Daeschel, 1989). Bakteriosin merupakan zat antimikroba berupa polipeptida, protein, atau senyawa yang mirip protein. Bakteriosin mencegah sintesis peptidoglikan yang utuh, sehingga dinding sel melemah dan akibatnya sel bakteri mengalami lisis. Selain itu, target utama dari bakteriosin yaitu membran sitoplasma dengan cara mengubah permeabilitasnya, sehingga transport membran terganggu dan akibatnya produksi energi dan biosintesis protein terhambat (Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

**Analisis Molekuler**

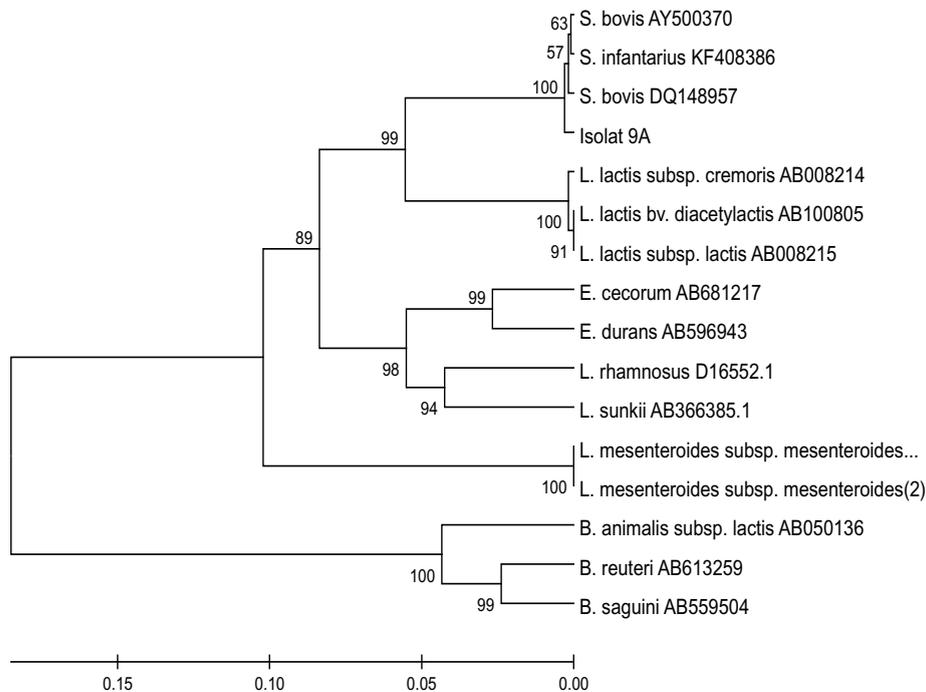
Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dapat dilihat dengan munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1.502 *base pairs* (bp) yang merupakan ukuran yang diharapkan dengan menggunakan kombinasi primer B27F dan U1492R (Gambar 1).



Gambar 2. Amplifikasi gen 16S rRNA BAL isolat 9A hasil isolasi kolon sapi bali dengan primer B27F dan U1492R pada agarose 1%. M: Marker 1kb. DNA ladder, 1: Isolat 9A.

Hasil sekuensing amplifikasi gen 16S rRNA dengan primer B27F dan U1492R didapat data nukleotida yang layak untuk dianalisis yaitu sepanjang 630 nukleotida. Hasil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) menunjukkan isolat 9A memiliki homologi (kemiripan) dengan *St. bovis* (DQ148957), *St. bovis* (AY500370) dan *St. sunkii* (AB366385.1) sebesar 99%. Serta memiliki kemiripan cukup jauh jika dibandingkan dengan *Bifidobacterium animalis sp.lactis* (AB050136), *B. saguini* (AB559504) dan *B. reuteri* (AB613259) (Data tidak ditunjukkan). Kemiripan yang tinggi dengan strain *Streptococcus bovis* (DQ148957)

dibuktikan dengan terletaknya isolat BAL 9A dalam 1 *cluster* dengan strain tersebut dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Nilai *bootstrap* menunjukkan kekerabatan yang dekat apabila memiliki nilai yang tinggi, yaitu lebih dari 70% atau di atas 70 (Mount, 2001). Petti (2007) menyatakan bahwa hasil identifikasi bakteri berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dapat diterima sebagai satu genus bila memiliki homologi lebih dari 97% dan sebagai satu spesies jika homologinya lebih dari 99%. Hasil ini selanjutnya dikonstruksi untuk menyusun pohon filogenetik dengan hasil seperti Gambar 2.



Gambar 3. Pohon filogenetik isolat 9A berdasarkan sekuen gen 16S rRNA

Bakteri *St. bovis* adalah bakteri Gram positif, fakultatif anaerobik, katalase dan oksidase negatif berbentuk coccus merupakan genus dari *Streptococcus* (Lozano *at al.*, 2014). Menurut Mantovani dan Russell (2002) *Streptococcus bovis* menghasilkan bakteriosin HC5 (Bovicin HC5) mampu menghambat bakteri *Clostridium aminophilum*. Bakteriosin *St. bovis* HC5 dapat

menghambat pembentukan metana pada ruminansia sebanyak 50% dan bahkan konsentrasi rendah Bovicin HC5 menyebabkan penurunan produksi metan yang signifikan (Lee *at al.*, 2002). Bovicin HC5 *St. bovis* stabil pada kondisi asam dan hanya mengikat bakteri yang sensitif pada pH kurang dari 6 (Haulihan and Russell, 2006).

### Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa bakteri asam laktat isolat 9A berpotensi digunakan sebagai sumber probiotik didukung dengan kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* sebesar 50,35% (36,56 - 61,47% ) dibandingkan antibiotika kontrol kloramphenikol. Bakteri asam laktat isolat 9A teridentifikasi sebagai *St. bovis* dengan nilai similaritas 99% dan berada satu kelompok dengan *St. bovis* nilai bootstrap sebesar 100.

### Daftar Pustaka

- Anindita, N. S. (2013) Identifikasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat Potensi Probiotik Pensintesis Conjugated Linoleic Acid (CLA). Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Batan, I. W. (2006) *Sapi Bali dan Penyakitnya*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Denpasar.
- Chenooll, E., Macian, M. C. and Aznar, R. (2003) Identification of *Canobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(4): 546-56.
- Daeschel, M. A. (1989) Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservation. *J Food Technol.* 43: 148-155.
- Hardjosubroto, W. (1994) *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. Gramedia Widiasarana Indonesia. Jakarta.
- Haulihan, A. J. and Russell, J. B. (2006) Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to target bacteria. [Journal of Applied Microbiology](#). 100 (1): 168-74.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (2001) *Mikrobiologi kedokteran* 2<sup>nd</sup> ed. Bagian Mikrobiologi. FKU Unair. Jakarta.
- Lambert, J. and Hull, R. (1996) Upper gastrointestinal tract disease and probiotics. *Asia Pacific J Clin. Nutr.* 5(1): 31-35
- Lee, S. S., Hsu, J. T., Mantovani, H. C. and Russell, J. B. (2002) The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro. *FEMS Microbiology Letters.* 217:51-55
- Lindawati, S. A. and Suardana, I. W. (2014). *Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi dari Kolon Sapi Bali sebagai Kandidat Unggul Biopreservatif*. Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Lozano, T. G., Ballester, P. P., Oroval, E. A. and Jonatan, A. G. (2014) Analysis of *Streptococcus bovis* infections at a monographic oncological centre. *J Cancer Res Ther.* 2(2): 34-35
- Mantovani, H.C. and Russell, J. B. (2002) The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* Hc5 (bovicin Hc5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen. *Anaerobe.* 8: 247-252
- Marshall, S. H. and Arenas, G. (2003) Antimicrobial peptides : A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnology.* 6 (2): 271-284
- Mount, D. W. (2001) *Phylogenetic prediction*. In: *Bioinformatic, Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor laboratory. New York Press
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K. and Nes, I. F. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol.* 174, 5686–5692
- Petti, P. A. (2007) Detection and identification of microorganisms by gene Amplification and Sequencing. *Clin Infect Disc.* 44 (8):1108-1114
- Suardana, I. W. and Suarsana, I. N. (2007) Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner*, 8 (4): 155 – 159.
- Sujaya I. N., Ramona Y., Utami D. N. M., Suariani N. L. P., Widarini N. P., Nociantri K. A., Nursini N. W. (2008) Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from Sumbawa mare milk. *Jurnal Veteriner.* 9: 52-59.
- Tamura K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8): 1596-1599
- Tangapo, A. M. (2006) Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (*Plantago major*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. FMIPA UNSRAT, Manado.
- Widodo. (2003) *Bioteknologi Industri Susu*. Penerbit Duawarna. Yogyakarta.