

**Analisis Aktivitas Antibakteri, Hemolisis Darah dan Identifikasi Molekuler
Isolat DTP1**

***Analysis of Antibacterial Activity, Blood Hemolysis and Molecular Identification of
DTP1 Isolates***

**Hasria Alang, Anggraini Putri Utami, Nur Jati Jagad,
Ninda Novita, Dwi Febriani Ningsih**

Prodi Bioteknologi, Institut Teknologi dan Kesehatan Muhammadiyah
Kalimantan Barat

*hasriaalangbio@gmail.com: 08124154606

ABSTRACT

*The administration of antibiotics to treat microbial infections has caused cases of resistance. Therefore, an antimicrobial compound is needed that can inhibit the growth of pathogens, but is safer. Isolates from fermented Malay food have been obtained, namely Isolate DTP1. The purpose of this study was to test the antimicrobial activity of isolate DTP1, hemolysis activity and molecular identification of the isolate. The method used was experimental, which began with the isolation of microbes from samples, antimicrobial tests, blood agar hemolysis tests and molecular identification. The data found were then presented in the form of tables and figures, then analyzed descriptively. The results of the study showed that isolate DTP1 was able to inhibit the growth of *E. coli* (10.06 mm) and *S. aureus* (10.63 mm). Isolate DTP1 based on blood hemolysis tests was non-hemolytic or safe. The results of molecular identification using the 16S rDNA sequence found that this isolate had a length of around 1550 bp and was 99.1% similar to *B. subtilis*. The results of the study concluded that the isolate DTP1 found in this study was *Bacillus subtilis*. These bacteria have antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* and are gamma hemolytic or non-pathogenic.*

Keywords : Antimicrobial, 16S Gene, Hemolysis, Pathogen

ABSTRAK

Pemberian antibiotik untuk mengatasi infeksi mikroba telah menyebabkan terjadinya kasus resistensi. Oleh sebab itu, diperlukan suatu senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan patogen, namun bersifat lebih aman. Telah diperoleh isolat dari pangan fermentasi melayu yaitu Isolat DTP1. Tujuan penelitian ini yaitu untuk menguji aktivitas antimikroba isolat DTP1, aktivitas hemolisis dan identifikasi molekuler isolat tersebut. Metode yang digunakan yaitu esperimental, yang diawali dengan isolasi mikroba dari sampel, uji antimikroba, uji hemolisis agar darah dan identifikasi molekuler. Data yang ditemukan selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, lalu dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat DTP1 mampu menghambat pertumbuhan *E.coli* (10,06 mm) dan *S.aureus* (10,63 mm). Isolat DTP1 berdasarkan uji hemolisis darah bersifat non hemolitik atau bersifat aman. Hasil identifikasi molekuler menggunakan sekuens 16S rDNA ditemukan bahwa isolat ini memiliki panjang berkisar 1550 bp dan 99,1% similar dengan *B.subtilis*. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat DTP1 yang ditemukan pada penelitian ini yaitu *Bacillus subtilis*. Bakteri tersebut memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dan bersifat gamma hemolitik atau non patogen.

Kata kunci : Antimicrobial, 16S Gene, Hemolysis, Pathogen

PENDAHULUAN

Pengobatan infeksi mikroba patogen seperti bakteri ataupun jamur, umumnya dilakukan melalui pemberian antibiotik. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa penanganan penyakit endemik di Indonesia dilakukan melalui pemberian antibiotik. Pengobatan melalui penggunaan antibiotik dilakukan baik menurut resep dokter maupun swamedikasi. Hal ini dikarenakan antibiotik sangat mudah ditemukan. Selain itu, tidak semua masyarakat Indonesia mengetahui aturan penggunaan ataupun efek samping pemakaian antibiotik yang irasional (Anggita et al., 2022).

Beberapa studi mengungkapkan bahwa penggunaan antibiotik untuk mengatasi infeksi mikroba patogen telah menyebabkan resistensi terhadap antibiotik (Alang et al., 2020), yang akhirnya berpengaruh pada efektivitas dan biaya pengobatan. Resistensi adalah suatu kondisi dimana mikroba patogen dapat bertahan hidup atau kebal terhadap pemberian antibiotik. Kasus resistensi antibiotik tidak hanya terjadi di Indonesia, namun telah menjadi masalah internasional (Liasi et al., 2009). Menurut (Marston et al., 2016), resistensi antibiotik disebabkan oleh berbagai faktor, diantaranya pemakaian antibiotik yang tidak tepat, pemakaian antibiotik yang irasional dan faktor genetik dari bakteri. Resistensi antibiotik tidak hanya meningkatkan mortalitas karena kegagalan dalam pengobatan, namun juga dapat mengganggu mikrobiota komensal di usus, yang berpotensi meningkatkan risiko alergi dan penyakit autoimun. Hal ini tentu menjadi ancaman serius bagi Kesehatan (Falakh & Asri, 2022).

Menurut Anggita et al. (2022) dan Damayanti et al. (2019), kampanye dan metode pengobatan yang tepat merupakan hal yang sangat diperlukan dalam menangani kasus tersebut. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa alternatif lain yang dapat digunakan untuk mengganti pemakaian antibiotik yaitu dengan menggunakan bahan alami atau antimikroba alami, salah satunya dari pangan fermentasi (Kiti et al., 2019; Mulyani et al., 2023; Ramadhanty et al., 2021).

Fermentasi merupakan metode pengolahan pangan yang bertujuan untuk memperpanjang masa simpan suatu pangan. Proses fermentasi akan menguraikan molekul organik yang besar menjadi molekul kecil, melalui bantuan mikroba baik berupa bakteri ataupun jamur (Aloysius et al., 2019). Selain itu, fermentasi juga akan meningkatkan mutu sebuah pangan, baik berupa peningkatan nilai gizi, rasa, aroma, dan bahkan beberapa jurnal menyebutkan bahwa pangan fermentasi digolongkan sebagai pangan fungsional, sehingga dapat meningkatkan kondisi kesehatan (Mulyani et al., 2023; Sharma et al., 2020).

Salah satu pangan tradisional fermentasi di Indonesia yaitu Tempoyak. Tempoyak terbuat dari fermentasi durian yang ditambahkan dengan garam (Ardilla et al., 2022). Tempoyak dapat ditemukan di daerah Suku Melayu, contohnya Kalimantan Barat Pontianak. Proses pengolahan durian menjadi tempoyak melibatkan aktivitas mikroba, sehingga diasumsikan bahwa mikroba tersebut menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat menghambat kerusakan pangan selama proses fermentasi akibat pangan patogen. Hal ini didukung oleh beberapa hasil penelitian yang menemukan berbagai jenis bakteri asam laktat (BAL) penghasil antimikroba dari pangan fermentasi (Nurhamidah et al., 2020; Rusmana et al., 2012; Surbakti & Hasanah, 2019; Wulandari et al., 2021). Bakteri asam laktat adalah merupakan kelompok bakteri yang aman dan telah banyak digunakan dalam industri pangan maupun sebagai antimikroba (Alang, 2020; Daten et al., 2022; Devi & Jatmiko, 2021).

Staphylococcus aureus dan *Eschericia coli* merupakan jenis patogen yang sering dikaitkan dengan mikroba pencemar makanan. Kedua jenis mikroba ini merupakan mikroba penyebab *food born disease* atau penyakit yang timbul karena konsumsi makanan. Salah satu mikroba yang telah diisolasi dari sampel tempoyak yaitu isolat TDP1, namun aktivitas antimikroba dan jenisnya belum diketahui. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari tempoyak dan menguji aktivitasnya sebagai antimikroba serta mengidentifikasi molekuler isolat BAL yang diperoleh. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah khazanah pengetahuan sehingga menjadi rujukan bagi peneliti yang ingin mengembangkan antibiotik berbahan BAL dari pangan fermentasi.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2024 hingga Januari 2025.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, ose, inkubator,

objek glass, Erlenmeyer, *shaker*, *spreader*, dan *hocky stik*, PCR, elektroforesis, mikropipet, *gel dock*, sedangkan bahan yang digunakan yaitu NaCl 0,86%, pewarnaan Gram, *Nutrien Broth*, *Nutrient Agar*, media *blood agar*, MRSA dan MRSB (*De Man Rogosa Sharp Agar dan Broth*), akadest, alkohol, 15 µl PCR Master Mix Nexpro, 3 µl sampel DNA Template (100 ng/µl), 3 µl Water, primer 16S rDNA 27F 5' AGAGTTTGATC{AC}TGGCTCAG 3', primer 1492R 5' TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT 3', *agarose*, TBE, kit ekstraksi DNA, *marker*, *loading dye*, dan *Ethidium Bromide* (EtBr).

Langkah-langkah penelitian

a. Isolasi mikroba dari sampel tempoyak

Isolasi BAL dilakukan dengan menggunakan medium spesifik untuk menumbuhkan BAL, yaitu medium MRS Adan B (*De Man Rogosa Sharp Agar dan Broth*). Isolat bakteri asam laktat dilakukan berdasarkan (Ismail et al., 2017). Sampel tempoyak diambil sebanyak 25 mL kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 225 mL NaCl 0,86% sebagai pengenceran 10^{-1} . Suspensi pengenceran 10^{-2} dibuat sampai dengan pengenceran 10^{-6} . Sampel diambil 0,1 mL dari setiap pengenceran diinokulasikan ke Cawan Petri steril, dituang medium MRSA steril kemudian dihomogenkan. Kultur bakteri dari tempoyak diinkubasi secara terbalik di dalam inkubator 37 °C selama 2 hari. Setiap koloni bakteri yang tumbuh dihitung dan diisolasi berdasarkan perbedaan morfologi (ukuran, bentuk, serta adanya zona bening yang terbentuk dari hidrolisis (CaCO_3)). Setiap isolat dimurnikan secara *spread plate* dengan mengambil 1 ose koloni dari sampel dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL NaCl 0,86% (10^{-1}), kemudian dibuat serial pengenceran hingga 10^{-6} . Suspensi bakteri setiap pengenceran disebar 0,1 ml pada permukaan medium MRSA steril menggunakan *spreader* atau *hocky stik*. Biakan bakteri diinkubasi secara terbalik didalam inkubator 37°C selama 48 jam. Semua isolat yang telah murni kemudian divalidasi menggunakan pewarnaan Gram. Isolat BAL dicirikan dengan Gram positif dan bentuk beluat atau batang. Isolat terpilih selanjutnya disimpan pada suhu -20 °C.

b. Uji patogenitas/uji hemolisis sel darah merah

Uji ini dilakukan untuk mengetahui karakter patogen dari suatu mikroba, termasuk BAL. Kultur setiap isolat bakteri pada media MRSA umur 24 jam distreak dengan ose pada media *blood agar*. Kultur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam kemudian diamati aktivitas β -*haemolysis* atau lengkap (*clear zone*), α -*hemolytic* atau sebagian (*green zone*) dan γ -*hemolytic* (tanpa zona atau non patogen) (Alang, 2019).

c. Aktivitas Antimikrobia Isolat Bakteri Asam Laktat terhadap Bakteri Patogen

Pengujian aktivitas antimikroba BAL terhadap patogen dilakukan menurut (Daten et al., 2022; Devi & Jatmiko, 2021; Manalu et al., 2020). Isolat BAL dari stok kultur diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam 10 mL MRS broth dan diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Bakteri patogen uji yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, yang digunakan untuk pengujian antimikrobia ditumbuhkan dalam medium NB (*Nutrient Broth*) dalam kondisi aerob pada suhu 37 °C. Aktivitas antimikroba isolat BAL terhadap bakteri patogen diuji menggunakan metode disk sumur agar (*disc diffusion methode*) pada Cawan Petri yang berisi media *Nutrien Agar*. Bakteri patogen uji ditumbuhkan dalam *Nutrient Broth* pada suhu 37 °C hingga fase pertumbuhan logaritmik dengan densitas 10^6 sel/mL. Kultur setiap isolat bakteri patogen diambil 100 µL dan diinokulasikan secara *spread plate* pada permukaan media NA dan diinkubasikan pada suhu 4 °C selama 1 jam untuk memperlambat pertumbuhannya. Setelah itu, kultur BAL umur 18 jam dengan densitas 10^7 sel/mL diambil sebanyak 50 µL dan ditetesi pada blank disk, lalu dikeringanginkan dan diletakkan dipermukaan agar yang mengandung mikroba patogen uji, diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antimikrobia isolat BAL terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling sumur. Zona bening 20 mm disebut kuat, 10-20 mm dikategorikan sedang dan kurang dari 10 mm disebut rendah.

d. Identifikasi isolat bakteri asam laktat kandidat probiotik Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

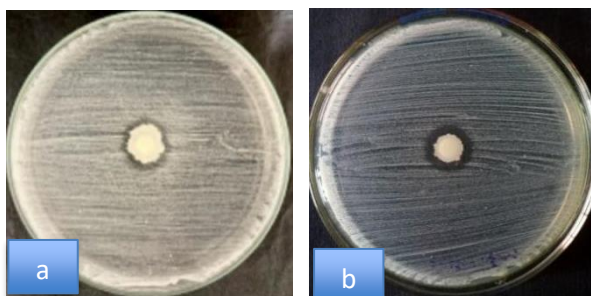
Isolat BAL terpilih adalah isolat BAL yang non patogen dan potensial sebagai penghasil antimikroba, diidentifikasi menurut (Alang et al., 2019). Ekstraksi DNA kromosom isolat terpilih menggunakan *i-genomic Soil DNA Extraction Mini Kit* yang telah dimodifikasi. DNA isolat yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi menggunakan sekuen 16S rDNA. Volume reaksi yaitu 50 μ L yang tersusun atas 25 μ L PCR master mix, 2.0 μ L masing-masing primer, 19.0 μ L ddH₂O, dan 2.0 μ L DNA template. Sekuen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan program PCR sebanyak 35 siklus yang tersusun atas denaturasi awal pada suhu 94 °C, 5 menit; denaturasi pada 94 °C, 1 menit; annealing 54 °C, 30 detik, ekstensi pada 72 °C, 1 menit dan ekstensi akhir 72 °C, 7 menit. Amplikon 16S rDNA dan marker 10.000 kb ladder DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1,5 % dengan pewarna 2 μ L *ethidium bromide* kemudian divisualisasi menggunakan UV-transluminator. Amplikon 16S rDNA dipurifikasi dan *sequencing* ^{1st}BASE Laboratories, Malaysia. Sekuen 16S rDNA dianalisis homologinya dengan data sekuen 16S rDNA acuan dari *GenBank* dan disubmit ke NCBI. Data sekuen 16S rDNA isolat BAL terpilih dialign dengan data sekuen isolat acuan untuk mengkonstruksi pohon filogeni dan dianalisis hubungan filogeninya menggunakan *Neighbor Joining* dengan *bootstrap* 1000 replikasi menggunakan program MEGA.

Pengolahan dan analisis data

Data hasil penelitian selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel dan gambar dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Telah dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari salah satu pangan tradisional masyarakat melayu, yaitu Tempoyak. Salah satu isolat yang ditumbuhkan diberi kode DTP1. Isolat tersebut selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri atau uji antagonis terhadap mikroba patogen, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Data hasil penelitian uji antagonis isolat terlihat pada gambar 1. Uji tersebut menunjukkan bahwa isolat DTP1 lebih efektif menghambat pertumbuhan *S. aureus* dibandingkan *E. coli*, seperti terlihat pada tabel 1.

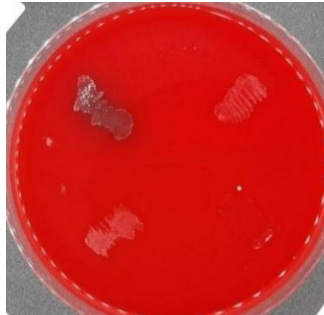


Gambar 1. Hasil uji antagonis DTP1 terhadap *E.coli* (a) dan *S.aureus* (b)

Tabel 1
Aktivitas antagonis dan antibakteri isolat DTP1 terhadap pathogen uji

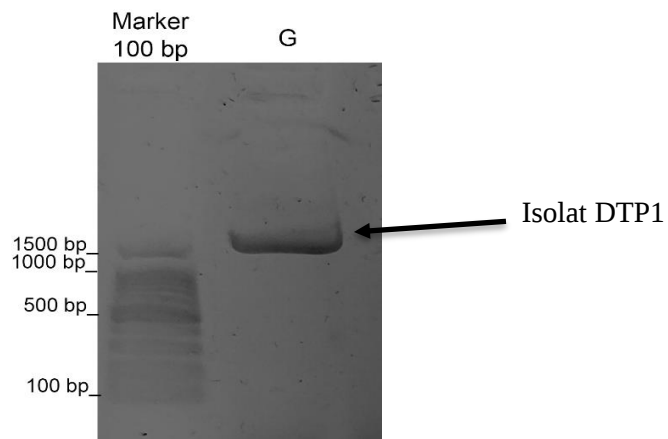
No	Patogen Uji	Zona Hambat
1.	<i>Escherichia coli</i>	10,06
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,63

Salah satu syarat pengembangan mikroba untuk digunakan sebagai antibiotik di masa mendatang yaitu isolat bersifat non patogen. Uji patogen isolat dilakukan melalui uji hemolisis menggunakan media agar darah. Uji ini berfungsi untuk mengetahui potensi patogen atau sifat patogenitas sebuah isolat. Hasil uji isolat DTP1 dengan replikasi sebanyak 3x diperoleh bahwa isolat DTP1 bersifat non hemolisis atau γ (gamma) hemolisis, seperti terlihat pada gambar 2.



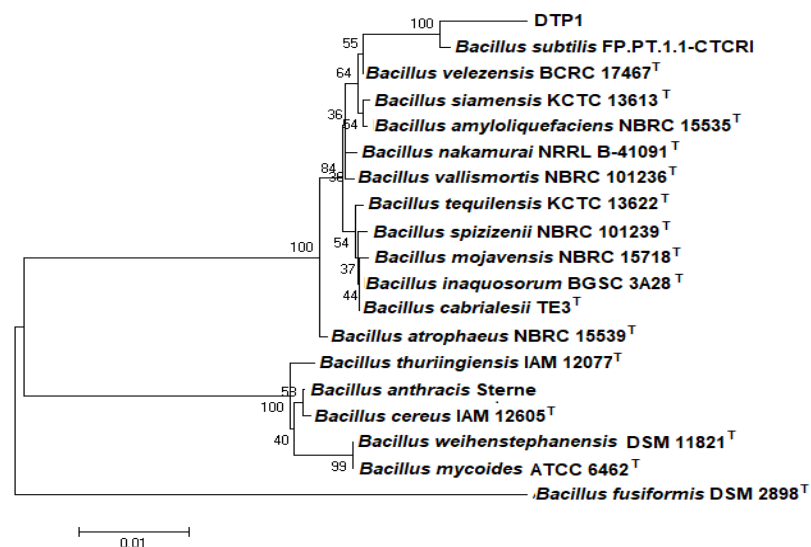
Gambar 2. Hasil uji hemolisis agar

Setelah diperoleh karakter patogenistisnya, maka isolat DTP1 selanjutnya diidentifikasi secara molekuler menggunakan penanda molekuler 16S rDNA. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa panjang sekuens isolat hasil amplifikasi yaitu berkisar 1550 (Gambar 3).



Gambar 3. Elektroforesis isolat DTP1 hasil PCR gen 16S

Hasil analisa sekuen 16S rDNA selanjutnya di BLAST pada NCBI dan menunjukkan bahwa isolat tersebut sangat identik dengan *Bacillus subtilis*, dengan nilai similaritas 99,1 %. Hasil analisis terlihat pada pohon filogeni (Gambar 4) dan tabel 2.



Gambar 4. Pohon filogeni isolat DTP1 yang diisolasi dari tempoyak

Tabel 2
Similaritas Isolat DTP 1 terhadap Bakteri Acuan

No.	Spesies	ACC Number	Distance	% Identity
1.	<i>Bacillus subtilis</i> FP.PT.1.1	MT068199.1	0,009	99,1
2.	<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T	NR_151897.1	0,018	98,2
3.	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	MW009674.1	0,018	98,2
4.	<i>Bacillus inaquosorum</i> BGSC 3A28 ^T	NR_104873.1	0,019	98,1
5.	<i>Bacillus cabrialesii</i> TE3 ^T	MK462260.1	0,019	98,1
6.	<i>Bacillus atrophaeus</i> NBRC 15539 ^T	NR_112723.1	0,019	98,1
7.	<i>Bacillus spizizenii</i> NBRC 101239 ^T	NR_112686.1	0,019	98,1
8.	<i>Bacillus mojaviensis</i> NBRC 15718 ^T	NR_112725.1	0,019	98,1
9.	<i>Bacillus velezensis</i> BCRC 17467 ^T	EF433407.1	0,015	98,5
10.	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	KY643639.1	0,016	98,4
11.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T	NR_041455.1	0,017	98,3
12.	<i>Bacillus vallismortis</i> NBRC 101236 ^T	NR_113994.1	0,018	98,2
13.	<i>Bacillus anthracis</i> Sterne	AF176321.1	0,071	92,9
14.	<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605 ^T	D16266.1	0,071	92,9
15.	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077 ^T	D16281.1	0,071	92,9
16.	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM 11821 ^T	AB021199.1	0,076	92,4
17.	<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6264 ^T	AB021192.1	0,076	92,4
18.	<i>Bacillus fusiformis</i> DSM 2898 ^T	AJ310083.1	0,071	92,9

PEMBAHASAN

Pangan fermentasi merupakan media yang mengandung nutrisi, sehingga dapat menjadi media pertumbuhan bagi mikroba (Pribadhi et al., 2021; Rusmana et al., 2012). Kehadiran mikroba pada pangan akan menyebabkan perubahan tekstur pangan tersebut. Salah satu kelompok mikroba yang ditemukan pada pangan fermentasi seperti yang telah ditemukan pada penelitian ini, yaitu isolat DTP1.

Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa isolat DTP1 mampu menghambat pertumbuhan patogen *E.coli* dan *S. aureus* (gambar 1 dan tabel 1). Kemampuan menghambat pertumbuhan patogen ini ditandai dengan timbulnya zona bening disekitar disk isolat. Sensitivitas bakteri terhadap antibakteri terlihat dari diameter zona hambat yang dihasilkan (Dewangga et al., 2019). Timbulnya zona hambat dikarenakan isolat DTP1 menghasilkan senyawa antimikroba. Hal ini didukung oleh (Malanovic & Lohner, 2016b) menyatakan bahwa bakteri gram positif dan gram negatif menghasilkan senyawa antimikroba.

Diameter zona hambat pertumbuhan *S. aureus* pada penelitian ini terlihat lebih besar (16,63 mm) dibandingkan zona hambat pertumbuhan *E.coli* (10,06 mm), yang berarti bahwa isolat DTP1 lebih efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Perbedaan ini dikarenakan *S.aureus* sebagai gram positif sedangkan *E.coli* sebagai gram negatif memiliki perbedaan penyusun dinding sel dan struktur membran plasmanya. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian (Savira et al., 2021) yang mengemukakan bahwa isolat dari umbi porang lebih efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus* dari pada *E.coli*, dan penelitian (Kusumawati et al., 2014) yang menyatakan bahwa bakteri endofit dari tanaman miana juga lebih efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus* dari pada *E.coli*. Hasil penelitian (Astari et al., 2021) juga menunjukkan bahwa isolat endofit dari kunyit juga efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus*. Hal ini dikarenakan beberapa peptida antimikroba yang dihasilkan oleh BAL memang memiliki target spesifik terhadap gram positif (Malanovic & Lohner, 2016a), sehingga pada hasil penelitian ini, zona hambat pada *S.aureus* lebih besar daripada *E.coli*.

Pengujian isolat DTP1 terhadap patogen uji menunjukkan bahwa isolat ini sangat potensial digunakan sebagai antimikroba di masa mendatang. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji patogenisitas. Menurut (Ketut et al., 2017), uji patogenisitas merupakan uji yang

sangat penting dilakukan untuk pengaplikasian mikroba kedepannya, sehingga benar-benar memastikan keamanan dari sebuah isolat kandidat antimikroba. Bakteri patogen ditandai dengan adanya alfa hemolis atau hemolisis sebagian yang ditandai dengan warna kehijauan disekitar koloni, ataupun beta hemolis atau hemolisis total yang ditandai dengan warna bening disekitar koloni, sedangkan bakteri non patogen tidak menghasilkan warna disekitar koloni atau disebut juga gamma hemolisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat DTP1 yang ditumbuhkan pada media agar darah tidak menunjukkan adanya zona bening (gambar 2). Hal ini berarti bahwa isolat tersebut bersifat aman dan tidak patogen karena tidak melisis sel darah pada media agar darah yang digunakan, sehingga aman dikembangkan sebagai kandidat antimikroba di masa mendatang.

Identifikasi molekuler diawali dengan melakukan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi tersebut selanjutnya di amplifikasi menggunakan primer spesifik sel prokaryotik yaitu sekuens gen 16S rDNA. Gen 16S merupakan bagian dari DNA prokaryotik yang paling umum digunakan untuk mengidentifikasi prokaryotik. Penggunaan sekuens 16S sebagai penanda molekuler dikarenakan sifatnya yang terkonservasi atau conserved pada prokaryotik (Akihary & Kolondam, 2020; Noer, 2021). Hasil amplifikasi selanjutnya dilakukan elektroforesis sebagai visualisasi untuk melihat perkiraan panjang bp pita (*band*) yang dihasilkan. Pada penelitian ini, hasil amplifikasi PCR isolat DTP1 menggunakan sekuens 16S rDNA menunjukkan bahwa panjang DNA berkisar 1550 bp (gambar 3). Hal ini sesuai dengan (Brown, 1999), yang menyatakan bahwa sekuens 16S rDNA memiliki ukuran antara 1500-1550. Hasil penelitian ini juga didukung oleh (Fajri et al., 2018; Nursyam & Prihanto, 2018) yang menemukan isolat bakteri dari endofit mangrove dan bakteri pada udang dengan hasil amplifikasi panjang berkisar 1500-1550 bp. Setelah elektroforesis, ampikon hasil PCR selanjutnya disequencing di *first base* Malaysia dan hasil sequencing selanjutnya di BLAST paada NCBI. Data hasil BLAST menunjukkan bahwa isolat tersebut mengelompok dengan *Bacillus subtilis* seperti yang terlihat pada gambar 4. Hasil uji similaritas menunjukkan bahwa isolat DTP1 tersebut memiliki similaritas dengan *Bacillus subtilis* sebesar 99,1% (tabel 2). Menurut (Akihary & Kolondam, 2020), sekuens yang memiliki homologi <97,5% dikatakan sebagai spesies yang berbeda atau spesies baru, sedangkan jika kemiripan telah mencapai 99%, maka spesies tersebut dikatakan sama. Hal ini berarti bahwa isolat DTP1 yang diisolasi dari Tempoyak merupakan spesies *Bacillus subtilis*.

Beberapa literatur menyebutkan bahwa *B.subtilis* merupakan patogen yang biasanya mengkontaminasi makanan dan menyebabkan gastrointestinal atau gangguan pada saluran pencernaan. Namun penelitian (Budianto & Suprastyani, 2018) menyebutkan bahwa bakteri ini sebenarnya adalah golongan probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. Selain itu, penelitian dari (Kusdini et al., 2024) menyebutkan bahwa bakteri ini berperan dalam bioremediasi salah satunya untuk menangani pencemaran akibat tumpahan minyak. Selain itu, penelitian (Dita et al., 2023) juga menyebutkan bahwa *B.subtilis* berperan sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) untuk kesuburan tanah. Meskipun sering dikaitkan sebagai patogen, namun gangguan akibat infeksi *B.subtilis* sangat berkaitan dengan system imun manusia.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa BAL yang ditemukan pada penelitian ini yaitu *Bacillus subtilis*. Bakteri tersebut memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dan bersifat gamma hemolitik atau non patogen.

SARAN

Penelitian ini masih menggunakan dua indikator mikroba pathogen, sehingga disarankan agar dilakukan uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan berbagai macam pathogen uji lainnya, baik bakteri maupun jamur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terimakasih kepada Sitoresmi Prabaningtyas, Muh. Dliyah,

dan Maulidiyah yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. (2020). Pemanfaatan Gen 16S sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian di Indonesia. *PHARMACON*, 9(1), 16–22. <https://doi.org/10.35799/PHA.9.2020.27405>
- Alang, H. (2019). *Studi Potensi Dan Gen Penyandi Bakteriosin Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kerbau Belang (Bubalus bubalis L.) Tana Toraja Sebagai Kandidat Probiotik Disertasi Oleh Hasria Alang 157090100111006 Program Doktor Biologi*. Universitas Brawijaya.
- Alang, H. (2020). Enterocin dari Genus Enterococcus sebagai Probiotik, Antimikroba dan Biopreservatif (Review: Enterocyn from Enterococcus Genus as a Probiotic. *Researchgate.Net*, 6(October), 95–99. <https://doi.org/10.33772/pharmauho>
- Alang, H., Kusnadi, J., Ardiyati, T., & Suharjono. (2019). Identification of lactic acid bacteria as antimicrobial from milk Toraja Belang buffalo. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1), 012092. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012092>
- Alang, H., Kusnadi, J., Ardyati, T., & Suharjono. (2020). Optimization and characterization of enterocin Enterococcus faecalis K2B1 isolated from Toraja's Belang Buffalo Milk, South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3), 1236–1242. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D210351>
- Aloysius, A., Ulfa, A., Situmorang, A. K. F., Harmileni, H., & Fachrial, E. (2019). Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Makanan Tradisional Fermentasi Khas Batak Naniura. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*, 6(1), 8–15. <https://doi.org/10.31289/BIOLINK.V6I1.2165>
- Anggita, D., Nuraisyah, S., & Wiriansya, E. P. (2022). Mekanisme Kerja Antibiotik: Review Article. *UMI Medical Journal*, 7(1), 46–58. <https://doi.org/10.33096/UMJ.V7I1.149>
- Ardilla, Y. A., Anggreini, K. W., & Rahmani, T. P. D. (2022). The role of indigenous lactic acid Bacteria Genus Lactobacillus in the fermentation process of Durian (*Durio zibethinus*) for Tempoyak production. *Berkala Ilmiah Biologi*, 13(2), 42–52. <https://doi.org/10.22146/bib.v13i2.4619>
- Astari, S. M., Rialita, A., & Mahyarudin, M. (2021). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit Tanaman Kunyit (*Curcuma longa L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 8(2), 9–16. <https://doi.org/10.33096/JFFI.V8I2.644>
- Brown, T. A. (1999). *Second Edition Genetics: Molecular Approach*. Chapman & Hall.
- Budianto, & Suprastyani, H. (2018). Aktivitas Antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. *Jurnal Veteriner*, 18(3), 409–415. <https://journal.literasisains.id/index.php/insologi/article/view/3483/1604>
- Damayanti, E., Istiqomah, L., Saragih, J. E., Majeed Salih, A., M Ali -, S. A., Ma, G., Niu, L., Han, F., Alang, H., Kusnadi, J., & Ardiyati, T. (2019). Identification of lactic acid bacteria as antimicrobial from milk Toraja Belang buffalo. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1), 012092. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012092>
- Daten, H., Ardyati, T., & Jatmiko, Y. D. (2022). Selection of potential lactic acid bacteria from fish intestine of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) from Lembata Regency, East Nusa Tenggara, Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 18(6), 580. <https://doi.org/10.21161/MJM.211302>
- Devi, I. S., & Jatmiko, Y. D. (2021). Selection of potential lactic acid bacteria from fermented Sumbawa mare's milk as starter cultures. *Malaysian Journal of Microbiology*, 17(1), 11. <https://doi.org/10.21161/MJM.190691>
- Dewangga, S., Nirwana, A. P., Tinggi, S., Kesehatan, I., & Surakarta, N. (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona squamosa*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Kusuma Husada*, 10(1), 50–56. <https://doi.org/10.34035/JK.V10I1.328>
- Dita, A., Gau, T., Sri, D., & Qadri, N. (2023). Efektivitas Kerapatan Bakteri *Bacillus subtilis*

- Terhadap Peningkatan Produksi Bawang Merah: *Perbal: Jurnal Pertanian Berkelanjutan*, 11(3), 439–447. <https://doi.org/10.30605/PERBAL.V11I3.3012>
- Fajri, B., Budiharjo, A., & Pujiyanto, S. (2018). Isolasi dan Identifikasi Molekuler bakteri Antagonis Terhadap *Vibrio parahaemolyticus* Patogen Pada Udang *Litopenaeus vannamei* Dari Produk Probiotik dan Sedimen Mangrove di Rembang. *Jurnal Akademika Biologi*, 7(1), 52–63. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Falakh, M. F., & Asri, M. T. (2022). Potential Test of Lactic Acid Bacteria Isolates from Palm Sap (*Borassus flabellifer* L.) as Antimicrobial against *Salmonella typhi*. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 11(3), 514–524. <https://doi.org/10.26740/LENTERABIO.V11N3.P514-524>
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Putriani, P. (2017). Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Bioleuser*, 1(2). <https://jurnal.usk.ac.id/bioleuser/article/view/9072>
- Ketut, D., Sukmadewi, T., Anas, I., Widyastuti, R., Citraresmini, A., Studi, P., Tanah, B., Lingkungan, D., Ipb, P., & Meranti, J. (2017). Uji Fitopatogenitas, Hemolisis serta Kemampuan Mikrob dalam Melarutkan Fosfat dan Kalium: *Jurnal Ilmu Tanah Dan Lingkungan*, 19(2), 68–73. <https://doi.org/10.29244/JITL.19.2.68-73>
- Kiti, A. A., Jamilah, I., & Rusmarilin, H. (2019). Aktivitas Antimikroba Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Pangan Pliek U terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan Khamir *Candida albicans* secara in Vitro. *JOURNAL OF HEALTHCARE TECHNOLOGY AND MEDICINE*, 4(1), 118–126. <https://doi.org/10.33143/JHTM.V4I1.174>
- Kusdini, Kastilon, Gumanti, R., Reflis, & Utama, S. P. (2024). Kajian Penggunaan Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Penanganan Tumpahan Minyak Mentah. *INSOLOGI: Jurnal Sains Dan Teknologi*, 3(3), 262–270. <https://doi.org/10.55123/INSOLOGI.V3I3.3483>
- Kusumawati, Endah, D., Pasaribu, Hasmi, F., & Bintang, M. (2014). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Current Biochemistry*, 1(1), 45–50. <https://doi.org/10.29244/cb.1.1.45-50>
- Liasi, S. A., Azmi, Hassan, Shuhaimi, M., Rosfarizan, & Ariff. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33–37.
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016a). Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* 2016, Vol. 9, Page 59, 9(3), 59. <https://doi.org/10.3390/PH9030059>
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016b). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 936–946. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2015.11.004>
- Manalu, R. T., Bahri, S., Melisa, M., & Sarah, S. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal Feses Manusia sebagai Antibakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Sainstech Farma: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 13(1), 55–59. <https://doi.org/10.37277/SFJ.V13I1.525>
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*, 316(11), 1193–1204. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2016.11764>
- Mulyani, R., Adi, P., & Yang, J. J. (2023). Produk Fermentasi Tradisional Indonesia Berbahan Dasar Pangan Hewani (Daging dan Ikan): A Review. *Journal of Applied Agriculture, Health, and Technology*, 1(2), 34–48. <https://doi.org/10.20961/jaht.v1i2.473>
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.30998/EDUBIOLOGIA.V1I1.8596>
- Nurhamidah, A., Warsidah, W., & Idiawati, N. (2020). Isolasi dan karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Ale-ale dan Cincalok. *Jurnal Laut Khatulistiwa*, 2(3), 85. <https://doi.org/10.26418/lkuntan.v2i3.34780>

- Nursyam, H., & Prihanto, A. A. (2018). Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Mangrove *Rizhopora mucronata* Penghasil Gelatinase (MMP2). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1), 143–147. <https://doi.org/10.17844/JPHPI.V21I1.21537>
- Pribadhi, A. N., Kusdiyantini, E., & Ferniah, R. S. (2021). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Pangan Fermentasi Cincalok Sebagai Penghasil Gamma-Aminobutyric Acid. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(1), 25–32. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v8i1.3906>
- Ramadhanty, M. A., Lunggani, A. T., & Nurhayati, N. (2021). Isolasi bakteri endofit asal tumbuhan mangrove *Avicennia marina* dan kemampuannya sebagai antimikroba patogen *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* secara in vitro. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 4(1), 16–22. <https://doi.org/10.14710/NICHE.4.1.16-22>
- Rusmana, I., Suwanto, A., & Nisa Rachmania Mubarik, dan. (2012). Senyawa Antimikroba Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam. *Jurnal Akuatika*, III(2), 135–145.
- Savira, H. G., Trimulyono, G., Biologi, J., Matematika, F., Pengetahuan, I., Universitas, A., & Surabaya, N. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri yang Diisolasi dari Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*) Terhadap *Escherichia coli* FNCC 0091 dan *Staphylococcus aureus* FNCC 0047. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 10(3), 347–355. <https://doi.org/10.26740/LENTERABIO.V10N3.P347-355>
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation* 2020, Vol. 6, Page 106, 6(4), 106. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6040106>
- Surbakti, F., & Hasanah, U. (2019). Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Acar Ketimun (*Cucumis sativus* L.) Sebagai Agensi Probiotik. *Jurnal Teknologi Pangan Dan Kesehatan (The Journal of Food Technology and Health)*, 1(1), 31–37. <https://doi.org/10.36441/JTEPAKES.V1I1.182>
- Wulandari, F., Nazaruddin, N., & Amaro, M. (2021). Pengaruh Jenis Bakteri Asam Laktat dan Lama Fermentasi terhadap Mutu Fisik, Kimia, Organoleptik, dan Mikrobiologi Tepung Mocaf. *Prosiding SAINTEK LPPM Universitas Mataram*, 3(November 2020), 169–181.