

Karakterisasi Isolat Bakteri Asam Laktat asal Urutan sebagai Kandidat Probiotik dengan Ketahanan Asam dan Aktivitas Antibakteri

Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolates from Urutan as Probiotic Candidates with Acid Resistance and Antibacterial Activity

Ni Made Sri Dwijastuti¹, I Gusti Agung Ayu Satwikha Dewi², Ni Putu Senshi Septiasari², Ni Putu Widiantari²

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar

²Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Bali Internasional

*sridwijastuti@poltekkes-denpasar.ac.id : 087860910392

ABSTRACT

*Urutan is a traditional fermented sausage from Bali. From Urutan samples, lactic acid bacteria (LAB) have been successfully isolated with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; however, further information regarding other characteristics of these isolates remains limited. This study aimed to characterize LAB isolates obtained from Urutan to evaluate their potential as probiotic candidates. The study involved morphological identification, Gram staining, and catalase testing, followed by evaluation of hemolytic activity, antibacterial activity against common pathogens (*E.coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Bacillus cereus*) using the agar well diffusion method, and acid tolerance testing at pH 2.0 to simulate gastrointestinal conditions. The results showed that 24 isolates exhibited typical LAB characteristics, including white to yellowish colony color, round shape, smooth margins, convex elevation, Gram-positive staining, and catalase-negative reactions. Three selected isolates (numbered 4, 6, and 60) were non-hemolytic, supporting their safety for probiotic use, and demonstrated acid tolerance with survival rates ranging from 48–87%. Antibacterial assays revealed moderate to vigorous inhibitory activity against the test pathogens. These isolates show potential as probiotics, but further in vitro and in vivo studies are needed.*

Keywords : Characterization, Lactic acid bacteria, Probiotics, Traditional fermentation, Urutan

ABSTRAK

Urutan merupakan sosis fermentasi tradisional khas Bali. Dari sampel Urutan, telah berhasil diisolasi bakteri asam laktat (BAL) dengan aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* maupun *S.aureus*, namun informasi lebih lanjut mengenai karakteristik dari isolat tersebut masih belum banyak diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi isolat BAL yang diperoleh dari produk fermentasi tradisional Urutan guna menentukan potensinya sebagai kandidat probiotik. Studi dilakukan dengan konfirmasi morfologi, pewarnaan Gram, dan uji katalase, yang kemudian dilanjutkan dengan evaluasi mengenai sifat hemolitik, aktivitas antibakteri terhadap beberapa jenis bakteri patogen (*E.coli*, *S.typhimurium*, dan *B.cereus*) menggunakan metode difusi sumuran agar, serta uji ketahanan terhadap kondisi pH asam (pH 2,0) untuk mensimulasikan kondisi saluran cerna. Hasil penelitian menunjukkan 24 isolat yang tumbuh, memenuhi karakteristik dasar BAL yaitu warna koloni putih/kekuningan, bentuk round, margin smooth, elevasi convex, Gram positif, dan katalase negatif. Tiga isolat terpilih yaitu isolat nomor 4, 6, dan 60 menunjukkan hasil uji hemolisis negatif yang mendukung keamanan penggunaannya sebagai probiotik, dan memiliki toleransi terhadap suasana asam dengan tingkat ketahanan berkisar antara 48–87%. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan kemampuan penghambatan ketiga isolat dengan kategori sedang hingga kuat terhadap bakteri uji. Isolat ini berpotensi dikembangkan sebagai probiotik, namun diperlukan penelitian lanjutan secara in vitro dan in vivo.

Kata kunci : Karakterisasi, Bakteri Asam Laktat, Probiotik, Fermentasi Tradisional, Urutan

PENDAHULUAN

Bakteri Asam Laktat merupakan kelompok mikroorganisme yang berperan penting dalam fermentasi pangan melalui konversi karbohidrat menjadi asam laktat sebagai produk utama, disertai pembentukan asam organik lain yang berkontribusi terhadap proses pengasaman dan pengawetan pangan. Bakteri Asam Laktat dapat tumbuh secara alami pada matriks pangan yang kaya karbohidrat dan protein. Selain menghasilkan asam laktat, metabolisme BAL juga mencakup jalur sitrat yang memungkinkan pembentukan senyawa volatil seperti diasetil, asetoin, dan 2,3-butanediol, yang berperan dalam pengembangan cita rasa khas produk fermentasi. Lebih lanjut, katabolisme asam amino oleh BAL menghasilkan beragam senyawa volatil serta peptida bioaktif yang dapat meningkatkan nilai gizi dan memberikan efek fungsional. Aktivitas enzimatik dari proses-proses metabolisme ini tidak hanya menentukan sifat sensoris, tetapi juga memperbaiki ketersediaan nutrien dan kualitas kesehatan dari produk akhir fermentasi (Anumudu *et al.*, 2024; Erem & Kilic-Akyilmaz, 2024).

Bakteri asam laktat yang dikenal sebagai *food grade bacteria*, telah digunakan secara luas dalam industri pangan sebagai starter fermentasi, pengawet alami (biopreservatif), dan probiotik dengan berbagai manfaat kesehatan. Secara historis, BAL diyakini memiliki peran dalam meningkatkan pencernaan nutrisi, meringankan gejala intoleransi laktosa, serta memproduksi zat-zat fungsional di saluran cerna. Aktivitas probiotiknya pun memiliki dampak luas terhadap aspek nutrisi, fisiologi, dan efek antimikroba (Panjaitan, 2018).

Manfaat BAL telah mendorong peningkatan minat komersial untuk mengembangkan aplikasi inovatif guna menghasilkan produk fungsional berbasis kelompok bakteri ini. Selain itu, hal tersebut juga memicu antusiasme para peneliti untuk mengeksplorasi potensi yang dimiliki oleh BAL. Berbagai penelitian terus dilakukan, mulai dari eksplorasi strain BAL dari sumber-sumber alami, studi karakteristik, fungsi, serta potensi aplikasinya, hingga pemahaman mekanisme reaksi yang mendasari karakteristik fungsional strain tersebut.

Bakteri Asam Laktat dapat ditemukan pada berbagai habitat seperti saluran pencernaan manusia dan hewan, tanaman, serta beragam produk pangan fermentasi (Mulyani *et al.*, 2023; Murwani *et al.*, 2024). Eksplorasi BAL dari makanan fermentasi tradisional Indonesia semakin berkembang, seiring meningkatnya minat terhadap pangan fungsional berbasis mikroba lokal. Keterbatasan informasi mengenai karakteristik BAL asli Indonesia menyebabkan pemanfaatannya sebagai produk pangan fungsional masih belum optimal (Priadi *et al.*, 2020).

Beberapa studi terkait BAL pada makanan fermentasi tradisional Indonesia telah dilakukan. Pada pangan fermentasi khas Suku Rejang, *Lemea*, berhasil diisolasi BAL yang teridentifikasi sebagai anggota genus *Leuconostoc* dengan potensi probiotik (Kurnia *et al.*, 2020). Pada penelitian lainnya, BAL yang teridentifikasi sebagai *Lactiplantibacillus plantarum* dan *Levilactobacillus brevis* berhasil diisolasi dari produk fermentasi Kalimantan yaitu *Cincalok*, *Tempoyak*, dan *Mandai*. Spesies ini berpotensi sebagai sumber probiotik dan biopreservatif untuk aplikasi pangan fungsional modern (Murwani *et al.*, 2024). Selain itu, tinjauan komprehensif menunjukkan bahwa berbagai pangan fermentasi berbahan hewani, seperti Terasi, Urutan, Bekasam, dan Naniura, secara konsisten melibatkan BAL dalam proses fermentasi serta berkontribusi terhadap mutu sensoris, keamanan, dan manfaat kesehatan (Mulyani *et al.*, 2023). Temuan-temuan ini menegaskan bahwa pangan fermentasi tradisional Indonesia merupakan sumber penting BAL dengan prospek besar untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik dan pangan fungsional.

Urutan merupakan sosis fermentasi khas Bali berbahan dasar daging dan lemak babi yang dicacah, dicampur bumbu rempah, kemudian dimasukkan ke dalam selongsong usus halus babi dan dijemur di bawah sinar matahari selama beberapa hari. Proses fermentasi spontan yang terjadi selama penjemuran ini didominasi oleh pertumbuhan alami BAL, seperti *Weissella*, *Lactococcus*, dan *Lactobacillus*, yang berperan penting dalam penurunan pH, pembentukan senyawa volatil, serta pengembangan tekstur dan cita rasa khas produk (Yogeswara *et al.*, 2024). Urutan tidak hanya memiliki kandungan gizi tinggi, tetapi juga merupakan produk tradisional yang mudah dibuat dan banyak dikonsumsi masyarakat Bali, sehingga relevan untuk dikaji sebagai sumber

isolat BAL lokal dengan kemampuan probiotik dan antimikroba.

Pada penelitian sebelumnya, penulis telah memperoleh 158 isolat BAL yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* maupun *S.aureus* dari Urutan (Dwijastuti, 2023). Aktivitas antagonis terhadap mikroba patogen enterik merupakan salah satu parameter *in vitro* yang esensial dalam karakterisasi strain probiotik (Binda *et al.*, 2020). Namun, informasi lebih lanjut mengenai karakteristik dari 158 isolat tersebut masih belum banyak diketahui. Padahal, setiap strain BAL perlu diketahui karakteristiknya secara spesifik untuk mengetahui potensinya bagi kesehatan.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik isolat BAL terpilih dari penelitian sebelumnya, dengan mengevaluasi patogenitas strain tersebut berdasarkan hasil uji hemolisis, uji ketahanan terhadap pH asam secara *in vitro*, serta aktivitas antibakteri dengan metode disk difusi agar terhadap bakteri enterik patogen. Dengan demikian, dapat diperoleh data karakteristik yang komprehensif mengenai ketiga isolat BAL terpilih, untuk dapat dikaji lebih lanjut dan diaplikasikan secara tepat sebagai kandidat probiotik.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Penelitian eksperimen ini menggunakan rancangan deskriptif eksploratif yang meliputi uji patogenitas berdasarkan sifat hemolitik, uji ketahanan terhadap pH asam, dan uji aktivitas antibakteri. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus-November tahun 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Bali Internasional, Kota Denpasar, Bali.

Bahan dan alat

Sampel penelitian adalah 58 kultur isolat BAL dari penelitian sebelumnya yang disimpan dalam stok gliserol pada suhu -20°C di laboratorium Mikrobiologi Universitas Bali Internasional. Viabilitas bakteri dipertahankan dengan melakukan peremajaan (*subkultur*) ketika masa simpan mencapai 12 bulan. Bakteri Asam Laktat yang diperoleh pada penelitian sebelumnya berjumlah 158 isolat, namun pada penelitian ini hanya digunakan 58 isolat, dengan alasan stok kultur beku isolat lainnya tidak berada dalam kondisi baik ketika penelitian ini dilakukan.

Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri Gram positif penyebab penyakit yang ditularkan melalui makanan yaitu: *Bacillus cereus* ATCC11778 serta bakteri Gram negatif yang merupakan bakteri enterik patogen: *Escherichia coli* ATCC25922 dan *Salmonella thypimurium* ATCC19430. Kultur bakteri uji diperoleh dari koleksi Lab. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan ditumbuhkan pada media Blood Agar (Blood Agar Base disuplementasi dengan 5% darah kambing defibrinasi).

Langkah-Langkah Penelitian

Peremajaan Isolat BAL

Disiapkan 58 kultur isolat BAL yang disimpan dalam stok gliserol. Sebanyak satu ose dari masing-masing isolat BAL tersebut dihomogenkan dalam 5ml *De Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) Broth (Merck) dan diinkubasi selama 24 jam dalam suasana anaerob pada suhu 37°C . Selanjutnya sebanyak satu ose kultur BAL dari MRS broth ditanam pada media MRS agar (Merck) dan diinkubasi selama 48 jam dalam suasana anaerob pada suhu 37°C .

Konfirmasi Bakteri Asam Laktat

Konfirmasi BAL dilakukan dengan uji katalase dan pewarnaan Gram. Uji Katalase dilakukan dengan menambahkan 1 ose isolat BAL kedalam dua tetes H_2O_2 3% diatas objek glass. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas oksigen sebagai hasil degradasi H_2O_2 oleh enzim katalase. Pada uji ini isolat bakteri yang diuji diharapkan menunjukkan hasil uji katalase negatif, sesuai dengan karakteristik BAL. Pewarnaan Gram dilakukan dengan mewarnai apusan bakteri dengan kristal violet 1%, garam iodin, alkohol 95%, dan safranin. Preparat yang

telah siap dibaca dengan mikroskop pada perbesaran 10 x 100 dengan minyak emersi untuk mengamati bentuk sel, susunan sel, dan sifat Gram. Bakteri asam laktat akan menunjukkan morfologi sel berbentuk batang berwarna ungu (Gram positif).

Seleksi Isolat BAL Berdasarkan Aktivitas Antibakteri

Seleksi isolat BAL dilakukan dengan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran agar (Nurhikmayani, 2018). Sebagai bakteri uji, digunakan kultur *overnight* bakteri *E.coli* ATCC 25922 yang dibuat suspensi dengan kekeruhan 0,5 McFarland. Sebanyak 100 μ l kultur BAL ditumbuhkan pada 5 ml media MRS broth (37°C , 24 jam, anaerob) kemudian disentrifugasi (8.000 rpm, 15 menit, 4°C) dan dipisahkan supernatannya. Sebanyak 100 μ l suspensi bakteri uji dipipet kedalam petridish, kemudian media MH (*Mueller Hinton*) agar (Oxoid) yang masih cair diatas suspensi bakteri kemudian dihomogenkan. Setelah media mengeras, dibuat sumuran dengan diameter 6mm. Selanjutnya, sebanyak 50 μ l supernat dari masing-masing isolat BAL diisi kedalam sumuran yang berbeda. Diamati zona bening yang terbentuk setelah diinkubasi (37°C , 24 jam). Tiga isolat dengan diameter zona hambat terbesar dipilih untuk uji lebih lanjut.

Uji Hemolitik

Masing-masing isolat BAL ditumbuhkan pada media *Blood Agar* (Oxoid) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang memperlihatkan zona bening atau zona berwarna kehijauan menunjukkan hemolisis positif. Sebagai kontrol positif, bakteri *B.cereus* ATCC11778 juga ditumbuhkan bersama dengan isolat BAL.

Uji Ketahanan pH Asam

Masing-masing sebanyak 100 μ l kultur BAL dalam media MRSB yang berumur 24 jam dimasukkan ke dalam 10 ml MRSB pH 2,0 dan 10 ml MRSB pH 7,0 sebagai kontrol. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 menit. Selanjutnya kultur diinokulasikan pada media MRSA dengan teknik *pour plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan alat colony counter. Masing-masing perlakuan dibuat sebanyak 3 kali replikasi.

Uji Aktivitas Antibakteri

Blank disk direndam dalam supernat kultur BAL selama kurang lebih 30 menit hingga supernat meresap sempurna. Sementara itu, dibuat suspensi bakteri uji (*E.coli*, *B.cereus*, *S.typhimurium*) sesuai dengan standar kekeruhan 0,5 Mc Farland, kemudian suspensi bakteri uji diusapkan pada media MH agar dengan teknik kirby bauer. Selanjutnya, *disk* dengan supernat kultur BAL diletakkan pada media MH yang telah ditanami bakteri uji, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Uji daya hambat dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

Pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh dari berbagai uji termasuk sifat morfologi, uji Gram, uji katalase, uji hemolitik, uji aktivitas antibakteri, dan uji ketahanan pH asam diolah dan disajikan dengan pendekatan deskriptif kualitatif dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian diinterpretasikan berdasarkan karakteristik fenotipik dan fungsional dari masing-masing isolat.

HASIL

Dari prosedur peremajaan stok gliserol, diperoleh 24 isolat yang dapat tumbuh dengan baik, sementara 34 lainnya ditemukan tidak menunjukkan pertumbuhan koloni pada media MRS agar. Selanjutnya, dari prosedur uji konfirmasi BAL diperoleh hasil yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1
Karakteristik pertumbuhan dan Sifat Gram Sampel Isolat BAL

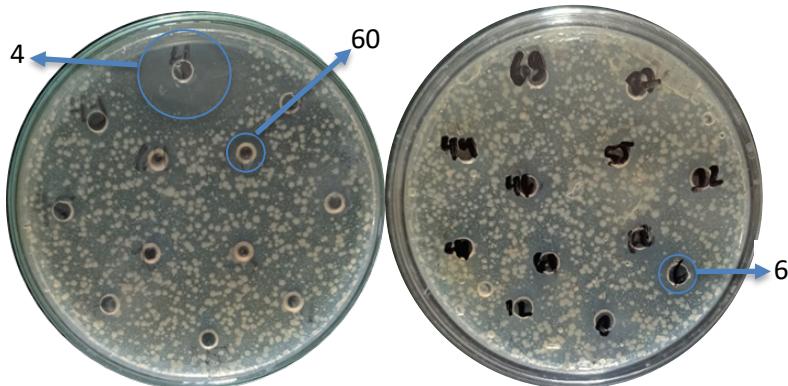
No	Karakteristik	Hasil Pengamatan	Jumlah Isolat
1	Warna	Putih	9
		Kekuningan	15
2	Konfigurasi	Bulat/ <i>round</i>	24
3	Margin	Halus/ <i>smooth</i>	24
4	Elevasi	Cembung/ <i>convex</i>	24
5	Sifat Gram	Positif	24
6	Bentuk Sel	Bulat/ <i>coccus</i>	12
		Batang/ <i>rod</i>	12
7	Uji Katalase	Negatif	24

Hasil pengamatan menunjukkan sebanyak 24 isolat BAL yang diuji memiliki warna koloni putih maupun kekuningan, konfigurasi/bentuk bulat, margin/tepi halus, elevasi/ketinggian cembung, bentuk sel bulat maupun batang, bersifat Gram positif, dan uji katalase negatif. Contoh morfologi koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada media MRS agar ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni BAL pada media MRS agar

Sejumlah 24 isolat BAL yang tumbuh dengan baik kemudian diseleksi untuk memilih isolat BAL yang menghasilkan diameter zona hambat terbesar terhadap pertumbuhan bakteri uji *E.coli* ATCC 25922. Hasil uji daya hambat (Gambar 2) menunjukkan, dari 24 isolat BAL yang diuji, terdapat satu isolat (no 4) yang menghasilkan zona hambat dengan diameter 2,5cm. Disamping itu, dua isolat lainnya yaitu isolat no 6 dan 60 menunjukkan zona hambat lemah dengan diameter kurang dari 1cm. Selanjutnya, tiga isolat tersebut dipilih untuk dilanjutkan untuk pengujian berikutnya.



Gambar 2. Zona hambat Isolat nomor 4, 6, dan 60 terhadap *E.coli*

Tiga isolat terpilih dilanjutkan dengan uji sifat hemolitik, yang dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media *Blood Agar* yang mengandung 5% darah kambing defibrinasi. Hasil uji hemolitik menunjukkan bahwa isolat BAL nomor 4, 6, dan 60 tidak menghasilkan zona jernih maupun perubahan warna di sekitar koloni, sehingga dikategorikan sebagai γ -hemolitik (non-hemolitik). Hemolisis β ditandai dengan terbentuknya zona bening akibat lisis total eritrosit, sedangkan hemolisis α menghasilkan zona kehijauan akibat reduksi parsial hemoglobin, keduanya menunjukkan indikasi potensi patogenitas (Kim *et al.*, 2024).

Tabel 2
Hasil Uji Ketahanan Isolat BAL Terpilih terhadap pH Asam

No Isolat	Rata-rata Jumlah Koloni		Penurunan Jumlah Koloni	Ketahanan (%)
	Perlakuan (pH 2)	Kontrol (pH 7)		
4	280,0	487,5	207,5 (42,6%)	57,4%
6	282,5	324,5	42,0 (12,9%)	87,1%
60	146,0	299,5	153,5 (51,3%)	48,7%

Berdasarkan hasil uji ketahanan pH asam yang ditampilkan pada Tabel 2, diketahui bahwa ketiga isolat BAL terpilih tetap dapat tumbuh dengan baik setelah mendapat perlakuan pH asam dengan persentase ketahanan yang berbeda-beda. Isolat nomor 6 menunjukkan tingkat ketahanan tertinggi yaitu 87,1% dengan rata-rata penurunan jumlah koloni setelah mendapat perlakuan asam hanya 42,0 koloni. Sementara uji ketahanan pH pada isolat nomor 4 dan 60 secara berturut-turut menunjukkan tingkat ketahanan 57,4% dan 48,7% dengan rata-rata penurunan jumlah koloni sebanyak 207,5 dan 153,5 koloni.

Dalam penelitian ini tidak dilakukan penyesuaian kepadatan awal inokulum, karena tujuan utama uji ketahanan pH asam adalah menilai persentase kelangsungan hidup isolat relatif terhadap kondisi kontrol netral (pH 7,0). Pendekatan ini lazim digunakan pada tahap skrining awal probiotik, di mana kultur *overnight* atau 24 jam langsung dipaparkan ke medium asam dan viabilitas dinilai berdasarkan perbandingan jumlah koloni yang bertahan hidup antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, tanpa menstandarisasi kepadatan awal sel (Meena *et al.*, 2022; Megur *et al.*, 2023; Mendonça *et al.*, 2023).

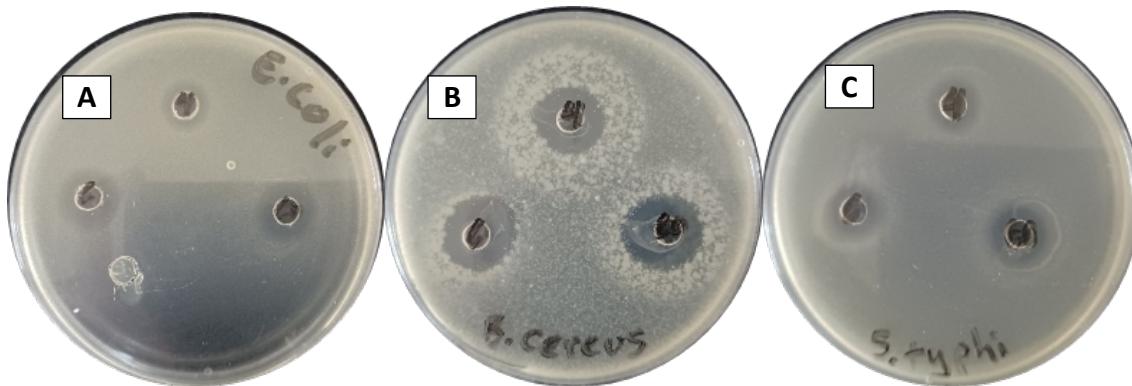
Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode disk difusi agar. *Blank disk* yang telah direndam dengan supernatant dari isolat BAL terpilih kemudian digunakan untuk pengujian.

Aktivitas antibakteri ditentukan dengan melakukan pengukuran diameter zona hambat. Hasil uji aktivitas antibakteri masing-masing isolat terpilih ditampilkan pada Tabel 3 dan Gambar 3 berikut.

Tabel 3
Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Isolat BAL Terpilih terhadap Bakteri Uji

Bakteri Uji	Nilai Rerata Diameter Zona Hambat Isolat BAL			Keterangan
	Isolat 04 (mm)	Isolat 06 (mm)	Isolat 60 (mm)	
<i>B. cereus</i>	11,00	11,00	12,50	Kuat
<i>S. typhimurium</i>	5,25	5,25	6,75	Sedang
<i>E.coli</i>	7,25	7,50	8,00	Sedang

Berdasarkan Davis & Stout (1971), besaran diameter zona hambat yang diperoleh dapat diklasifikasikan menjadi 4 kategori yaitu diameter >20 mm termasuk kategori sangat kuat, 10-20 mm kategori kuat, 5-10 mm sedang, dan <5 mm termasuk lemah atau tidak ada respon. Dengan demikian, aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh ketiga isolat terpilih termasuk dalam kategori sedang untuk bakteri uji *E.coli* dan *S.typhimurium*, serta termasuk dalam kategori kuat dalam menghambat bakteri uji *B.cereus*.



Gambar 3. Hasil Uji Zona Hambat Isolat BAL terhadap *E.coli* (A), *B.cereus* (B), dan *S.typhimurium* (C)

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, karakterisasi isolat BAL yang diperoleh dari produk Urutan menunjukkan beberapa aspek penting yang perlu dikaji secara mendalam dalam konteks seleksi probiotik. Hasil konfirmasi isolat yang didasarkan pada pengamatan morfologi koloni, uji Gram, dan uji katalase menunjukkan bahwa sebanyak 24 isolat yang tumbuh pada media MRS agar memiliki karakteristik khas BAL, yakni koloni berwarna putih atau kekuningan, bentuk bulat, margin halus, elevasi convex, serta bersifat Gram positif dan menghasilkan reaksi katalase negatif. Temuan ini didukung oleh Chen & Hang (2019) yang menyatakan bahwa sifat Gram positif dan respons negatif terhadap uji katalase merupakan indikator keaslian dan potensi BAL sebagai agen fermentasi yang aman. Penelitian terdahulu menyebutkan, karakteristik morfologis dan fisiologis BAL menjadi acuan dasar dalam pemilihan strain untuk aplikasi bioteknologi dan probiotik (Mozzi *et al.*, 2010).

Seleksi awal yang didasarkan pada kemampuan menghasilkan zona hambat terhadap *E.coli* menghasilkan tiga isolat unggulan, yaitu isolat nomor 4, 6, dan 60. Aktivitas antibakteri ini merupakan salah satu parameter penting untuk menilai potensi probiotik, mengingat kemampuan

untuk menghambat pertumbuhan patogen merupakan salah satu mekanisme utama manfaat kesehatan yang ditawarkan oleh BAL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hou *et al.*, (2025) yang menekankan pentingnya aktivitas antibakteri dalam menentukan kemampuan probiotik. Aktivitas tersebut dapat berkontribusi pada pengurangan populasi patogen di saluran cerna, sehingga meminimalkan risiko infeksi dan gangguan kesehatan yang terkait.

Salah satu mekanisme utama aktivitas antibakteri BAL adalah kemampuannya menghasilkan berbagai senyawa antimikroba, termasuk bakteriosin. Bakteriosin merupakan peptida yang disintesis secara ribosomal dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen maupun pembusuk melalui beberapa mekanisme, seperti pengikatan pada prekursor dinding sel, pembentukan pori pada membran, serta gangguan terhadap fungsi enzim esensial, yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel target (Wu *et al.*, 2022; Yadav & Tiwari, 2023). Aktivitas ini bekerja secara sinergis dengan penurunan pH akibat produksi asam laktat dan pembentukan hidrogen peroksida, sehingga tidak hanya menekan kolonisasi patogen tetapi juga membantu menjaga stabilitas flora usus serta memperkuat dominasi BAL dalam ekosistem mikroba (Hou *et al.*, 2025)..

Hasil uji menunjukkan isolat BAL memberikan zona hambat yang lebih besar terhadap *B.cereus* dibandingkan *E.coli* dan *S.typhimurium* (tabel 3). Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan struktur dinding sel. *Bacillus cereus* merupakan bakteri Gram positif yang tidak memiliki lapisan membran luar berupa lipopolisakarida seperti pada *E.coli* dan *S.typhimurium* yang merupakan bakteri Gram negatif. Hal ini menyebabkan penetrasi senyawa antibakteri dari BAL lebih efektif pada bakteri Gram positif (Mozzi *et al.*, 2016). Penelitian lain juga melaporkan hasil serupa, BAL cenderung menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes* dibanding *E.coli* (Hou *et al.*, 2025). Penelitian lain juga menyebutkan, senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh BAL yaitu bakteriosin, umumnya bekerja lebih efektif terhadap bakteri Gram positif (Chen & Hang, 2019).

Jika dibandingkan dengan penelitian sejenis, zona hambat yang diperoleh dalam penelitian ini tergolong kompetitif dalam konteks antibakteri terhadap bakteri positif. Sebagai contoh, *Lactococcus lactis*, Leuconostoc, Lactobacillus, dan kultur yoghurt dilaporkan menghasilkan *inhibitory zone* pada kisaran 14–16 mm terhadap *B.cereus* (Lima KA *et al.*, 2022), sedangkan beberapa isolat BAL dari produk fermentasi khas Nigeria yaitu Kunu dan Nono menunjukkan zona hambat >15 mm terhadap *B. cereus* (Imade *et al.*, 2021). Walaupun data spesifik untuk suhu 37°C atau kondisi kultur langsung tidak sepenuhnya sama, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat BAL dari Urutan berpotensi mengimbangi beberapa strain BAL yang telah dijelaskan dalam studi terdahulu.

Pembahasan mengenai aktivitas antibakteri lebih lanjut menunjukkan bahwa meskipun ketiga isolat menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan patogen, perbedaan nilai diameter zona hambat antara isolat mencerminkan variabilitas dalam produksi senyawa antibakteri. Data pada Tabel 3 dan Gambar 2 mengindikasikan adanya perbedaan aktivitas antibakteri di antara isolat.

Secara fundamental, aktivitas antibakteri BAL berasal dari produk metaboliknya, seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Perbedaan aktivitas antibakteri antar strain BAL sebagian besar dipengaruhi oleh variasi dalam regulasi genetik dan jalur metabolismik masing-masing strain. BAL dapat menghasilkan senyawa antimikroba yang bervariasi antar strain. Dengan demikian beberapa strain dapat menurunkan PH lingkungan secara drastis ataupun menghasilkan bakteriosin dengan spektrum kerja yang lebih luas. Variasi senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL disebabkan oleh perbedaan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam jalur metabolisme terutama pada jalur fermentasi (Hou *et al.* 2025).

Aktivitas antibakteri sangat bergantung pada karakteristik spesifik genetik dari setiap strain. Perbedaan dalam profil genetik menentukan variasi dalam regulasi jalur metabolismik. Hal ini menyebabkan variasi dalam aktivitas enzimatik yang kemudian mengubah konsentrasi dan jenis metabolit akhir yang dihasilkan oleh masing-masing strain BAL. Dengan demikian, meskipun semua BAL memiliki mekanisme dasar yang sama dalam menghasilkan asam laktat, namun

perbedaan regulasi dan jalur metabolismik memungkinkan beberapa strain menghasilkan metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri yang jauh lebih tinggi (Patil *et al.*, 2021). Selain itu, variasi lingkungan fermentasi juga turut mempengaruhi regulasi genetik BAL dalam memproduksi metabolit sekunder. Kondisi fermentasi seperti pH, suhu, dan jenis substrat, berperan penting dalam pengaturan ekspresi gen penyandi metabolit sekunder untuk menghasilkan senyawa antimikroba yang berbeda untuk setiap strain BAL (Mozzi *et al.*, 2016).

Uji hemolitik merupakan parameter krusial dalam penentuan keamanan penggunaan BAL sebagai probiotik. Aktivitas hemolitik adalah salah satu faktor virulensi pada bakteri patogen yang dapat merusak sel darah merah dan membahayakan inang (Kim *et al.*, 2024). Sebagai kandidat probiotik, BAL harus menunjukkan respon negatif terhadap hemolisis untuk memastikan tidak adanya potensi patogenik terhadap sel darah (Hou *et al.*, 2025). Uji hemolitik yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga isolat unggulan tidak menimbulkan zona hemolisis pada media *Blood Agar*, sehingga dapat dianggap aman untuk aplikasi sebagai probiotik. Hal ini juga didukung oleh Binda *et al.*, (2020), yang menyatakan bahwa aspek keamanan, khususnya non-hemolitik yang ditunjukkan oleh BAL, merupakan salah satu kriteria penting dalam pemilihan strain untuk aplikasi pangan dan kesehatan.

Aspek ketahanan terhadap pH asam juga merupakan parameter krusial mengingat kemampuan BAL untuk bertahan di lingkungan asam lambung merupakan indikator vital untuk efektivitas probiotik (Patil *et al.*, 2021). Bakteri Asam Laktat yang memiliki kemampuan bertahan dalam kondisi pH ekstrem memiliki peluang lebih besar untuk mencapai usus dalam keadaan hidup dan aktif secara fungsional (Chen & Hang, 2019). Penilaian ketahanan asam pada isolat BAL umumnya mengacu pada tingkat viabilitas setelah dipaparkan pada kondisi simulasi lambung. Pada penelitian terkait, strain dengan viabilitas $\geq 80\%$ dikategorikan sangat toleran terhadap asam (Ko *et al.*, 2022), sedangkan penelitian lainnya menggunakan batas $\geq 50\%$ sebagai kriteria strain yang masih dianggap resisten terhadap pH rendah (Zommara *et al.*, 2023). Berdasarkan kriteria tersebut, isolat nomor 6 dengan tingkat ketahanan 87,1% dapat dikategorikan memiliki toleransi asam yang baik, sedangkan isolat nomor 4 (57,4%) masih berada pada kategori cukup, dan isolat nomor 60 (48,7%) termasuk rendah.

Berdasarkan hasil penelitian, tidak semua BAL memiliki kemampuan yang sama untuk bertahan dalam kondisi ekstrem. Isolat nomor 6 yang menunjukkan tingkat ketahanan paling tinggi setelah perlakuan pH 2,0 mengindikasikan mekanisme adaptasi yang lebih baik. Keberadaan mekanisme toleransi asam pada BAL merupakan kunci untuk aplikasi probiotik yang efektif, terutama dalam menghadapi tantangan lingkungan asam di lambung (Chen & Hang, 2019). Perbedaan hasil ini juga dapat dipengaruhi oleh kondisi perlakuan yang digunakan. Variasi pH dan waktu inkubasi berkontribusi signifikan terhadap kelangsungan hidup BAL, di mana semakin rendah pH dan semakin lama paparan, maka tingkat viabilitas cenderung menurun (Ko *et al.*, 2022; Zommara *et al.*, 2023).

Berdasarkan hasil penelitian, meskipun terdapat variasi antar isolat, parameter-parameter utama seperti uji hemolitik, ketahanan pH asam, dan aktivitas antibakteri telah memberikan gambaran yang cukup jelas mengenai potensi masing-masing strain. Hasil ini mengkonfirmasi kembali peran penting BAL dalam fermentasi pangan tradisional Indonesia dan menunjukkan bahwa sumber non-susu, seperti Urutan, dapat menjadi sumber alternatif untuk pengembangan probiotik. Diversifikasi sumber BAL dapat meningkatkan variasi strain yang tersedia dan aplikasi beragam dalam industri pangan (Manalu *et al.*, 2020). Dengan demikian, penelitian ini memperkaya basis data nasional mengenai karakteristik dan potensi probiotik BAL, serta memberikan dasar bagi pengembangan produk pangan fungsional yang lebih inovatif dan aman untuk masyarakat. Eksplorasi sumber-sumber alami BAL, terutama dari makanan fermentasi tradisional, merupakan strategi yang efektif untuk menemukan strain-strain baru dengan potensi probiotik yang tinggi.

Meskipun demikian, penelitian ini masih memiliki beberapa keterbatasan, salah satunya terkait kondisi isolat dari kultur stok beku. Dari total 58 isolat, hanya 24 yang mampu tumbuh kembali saat dikultur ulang. Hal ini menunjukkan adanya masalah viabilitas yang kemungkinan

besar disebabkan oleh penyimpanan stok beku yang kurang optimal. Proses pembekuan diketahui dapat menimbulkan stres pada sel bakteri, termasuk kerusakan membran dan gangguan fungsi intraseluler, sehingga menurunkan kemampuan sel untuk pulih setelah thawing (Wang *et al.*, 2025). Faktor lain seperti fluktuasi suhu selama penyimpanan juga dapat memperburuk kondisi viabilitas isolat. Praktik penyimpanan bakteri yang tidak tepat, misalnya tanpa penggunaan krioprotektan atau tanpa kontrol suhu yang stabil, berkontribusi terhadap penurunan jumlah isolat yang dapat dipulihkan (Thermo Fisher Scientific, 2025). Kondisi ini tidak hanya mengurangi jumlah isolat yang dapat dianalisis lebih lanjut, tetapi juga berpotensi menimbulkan bias dalam representasi keragaman genetik dan fenotipik populasi BAL yang sebenarnya.

Selain itu, metode analisis yang digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri hanya mengandalkan pengukuran zona hambat, padahal teknik penentuan konsentrasi inhibitor seperti uji MIC ataupun metode analisis molekuler untuk mengeksplorasi ekspresi genetik dan jalur metabolismik yang mendasari produksi senyawa antimikroba dapat memberikan gambaran yang lebih mendalam tentang mekanisme kerja setiap strain BAL. Kelemahan ini mengindikasikan bahwa perbedaan aktivitas antibakteri antar strain mungkin tidak dapat dijelaskan secara komprehensif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa BAL yang berhasil diisolasi dari produk fermentasi tradisional *Urutan* memiliki karakteristik yang mendukung potensinya sebagai kandidat probiotik. Isolat terpilih menunjukkan toleransi terhadap kondisi pH asam, aktivitas antibakteri dengan kategori sedang hingga kuat terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Bacillus cereus*, serta tidak menunjukkan aktivitas hemolitik. Temuan ini menegaskan bahwa BAL dari *Urutan*, khususnya isolat nomor 6 dengan ketahanan terhadap asam paling tinggi (87%), berpotensi untuk dikaji lebih lanjut sebagai kandidat probiotik.

SARAN

Untuk pengembangan lebih lanjut, disarankan agar beberapa aspek ditingkatkan pada penelitian berikutnya. Perlu dilakukan optimasi metode penyimpanan isolat dalam kultur stok beku, serta memastikan stabilitas suhu selama penyimpanan untuk mempertahankan viabilitas isolat dalam jangka panjang. Selain itu, diperlukan peningkatan jumlah sampel dan sumber *Urutan* yang lebih beragam agar representasi isolat BAL menjadi lebih luas dan mencerminkan keragaman mikroba pada produk tradisional tersebut secara komprehensif. Selanjutnya, diperlukan uji ketahanan tambahan terhadap kondisi fisiologis lain di saluran cerna, seperti keberlangsungan hidup pada paparan garam empedu dan kemampuan adhesi terhadap sel epitel usus *in vitro*. Terakhir, untuk mengonfirmasi manfaat fungsional sebagai probiotik, disarankan dilakukan uji *in vivo* menggunakan hewan model agar dapat mengevaluasi aspek imunologis, kolonisasi usus, dan efek kesehatan yang ditimbulkan secara menyeluruh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Bali Internasional atas Hibah Penelitian Skema Peneliti Muda Tahun Akademik 2023/2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024). Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. In *Foods* (Vol. 13, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods13233714>
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary

- Supplements. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Chen, W., & Hang, F. (2019). Lactic Acid Bacteria Starter. In *Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4>
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error1. In *Applied Microbiology*. <https://journals.asm.org/journal/am>
- Dwijastuti, N. M. S. (2023). Eksplorasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Antibakteri dari Urutan sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Analis Kesehatan*, 12(1).
- Erem, E., & Kilic-Akyilmaz, M. (2024). The role of fermentation with lactic acid bacteria in quality and health effects of plant-based dairy analogues. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 23, Issue 4). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13402>
- Hou, Y., Duan, Y., Wu, G., Zhang, J., Luo, X., Zhang, M., Pang, H., Hao, Y., Wang, Y., Cai, Y., Wang, L., & Tan, Z. (2025). Antibacterial Activity, Probiotic Potential, and Biocontrol Efficacy of Two Lactic Acid Bacteria Against *Penicillium expansum* on Fresh Grapes. *Foods*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/foods14030493>
- Imade, E. E., Omonigho, S. E., Babalola, O. O., & Enagbonma, B. J. (2021). Lactic acid bacterial bacteriocins and their bioactive properties against food-associated antibiotic-resistant bacteria. *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01652-6>
- Kim, J., Jo, J., Cho, S., & Kim, H. (2024). Genomic insights and functional evaluation of *Lacticaseibacillus paracasei* EG005: a promising probiotic with enhanced antioxidant activity. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1477152>
- Ko, H. I., Jeong, C. H., Hong, S. W., Eun, J.-B., & Kim, T.-W. (2022). Optimizing Conditions in the Acid Tolerance Test for Potential Probiotics Using Response Surface Methodology. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01625-22>
- Kurnia, M., Amir, H., Handayani, D., & Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP, P. (2020). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dari Makanan Tradisional Suku Rejang Di Provinsi Bengkulu: "LEMEA." *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 4(1), 25–32.
- Kwok, L. (2014). Lactic Acid Bacteria and the Human Gastrointestinal Tract. In *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*.
- Lima KA, Geetha R, Sathian CT, & Lejaniya AS. (2022). A Study on Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria against *Bacillus cereus*. In *The Indian Veterinary Journal* (Vol. 99, Issue 06).
- Manalu, R. T., Bahri, S., & Sarah, S. (2020). *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal Feses Manusia sebagai Antibakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus*. 55–59.
- Meena, K. K., Taneja, N. K., Jain, D., Ojha, A., Kumawat, D., & Mishra, V. (2022). In Vitro Assessment of Probiotic and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Indigenously Fermented Cereal-Based Food Products. *Fermentation*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/fermentation8100529>
- Megur, A., Daliri, E. B. M., Balnionytė, T., Stankevičiūtė, J., Lastauskienė, E., & Burokas, A. (2023). In vitro screening and characterization of lactic acid bacteria from Lithuanian fermented food with potential probiotic properties. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1213370>
- Mendonça, A. A., Pinto-Neto, W. de P., da Paixão, G. A., Santos, D. da S., De Moraes, M. A., & De Souza, R. B. (2023). Journey of the Probiotic Bacteria: Survival of the Fittest. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010095>
- Mozzi, Fernanda., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. . (2016). *Biotechnology of lactic acid bacteria : novel applications*. Wiley-Blackwell.
- 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). <https://doi.org/10.20961/jaht.v1i2.473>
- Murwani, R., Anggraeni, R., Setiawan, G. N. A., Astari, P. D., Cahyani, N. K. D., Sibero, M. T., & Ambariyanto, A. (2024). Lactic Acid Bacteria Isolates and the Microbiome of Cincalok, Tempoyak, and Mandai: A Traditional Fermented Food from Kalimantan Island, Indonesia. *International Journal of Food Science*, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/6589766>
- Nurhikmayani, R. (2018). *Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin pada Fermentasi Ikan Chao Sulawesi Selatan*. Universitas Gadjah Mada .
- Panjaitan, R. N. L. D. R. (2018). *Potensi Prebiotik Isolat Bakteri Asam Laktat asal Tempe dan Tape*. Institut Pertanian Bogor.
- Patil, Y. M., Patwardhan, R. B., & Abhyankar, P. S. (2021). Improving the Gut Microbiota with Probiotics and Faecal Microbiota Transplantation. In *Journal of Pure and Applied Microbiology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 1111–1124). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.53>
- Pato, U. (2003). *Potensi Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker*. <https://www.researchgate.net/publication/267698938>
- Priadi, G., Setiyingrum, F., Afifi, F., Irzaldi, R., & Lisdiyanti, P. (2020). Studi In Vitro Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik Dari Makanan Fermentasi Indonesia. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 31(1), 21–28. <https://doi.org/10.6066/jtip.2020.31.1.21>
- Thermo Fisher Scientific. (2025). *Storing Bacterial Samples for Optimal Viability*. Thermo Fisher Scientific Microbiology Learning Center.
- Wang, J., Wu, P., Dhital, S., Yu, A., & Chen, X. D. (2025). Impact of Freezing and Freeze Drying on Lactobacillus rhamnosus GG Survival: Mechanisms of Cell Damage and the Role of Pre-Freezing Conditions and Cryoprotectants. *Foods*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/foods14101817>
- Wu, D., Dai, M., Shi, Y., Zhou, Q., Li, P., & Gu, Q. (2022). Purification and characterization of bacteriocin produced by a strain of Lacticaseibacillus rhamnosus ZFM216. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1050807>
- Yadav, M. K., & Tiwari, S. K. (2023). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. In *Microbiology (Russian Federation)* (Vol. 92, Issue 6, pp. 745–765). Pleiades Publishing. <https://doi.org/10.1134/S0026261723600520>
- Yogeswara, I. B. A., Nursini, N. W., Kusumawati, I. G. A. W., & Kusumaningsih, P. (2024). Metagenomic Insights into the Bacterial Diversity of Balinese Fermented Sausage (Urutan) from the Household Industry. *Fermentation*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/fermentation10120629>
- Zommara, M., El-Ghaish, S., Haertle, T., Chobert, J. M., & Ghanimah, M. (2023). Probiotic and technological characterization of selected Lactobacillus strains isolated from different egyptian cheeses. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02890-1>