DETEKSI GEN PLANTARISIN A PENGKODE BAKTERIOSIN PADA KELOMPOK *Lactobacillus casei*

SKRIPSI

Oleh :
SALMA AINU NISA
NIM. 17620083

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021

DETEKSI GEN PLANTARISIN A PENGKODE BAKTERIOSIN PADA KELOMPOK *Lactobacillus casei*

SKRIPSI

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh :
SALMA AINU NISA
NIM. 17620083

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021

DETEKSI GEN PLANTARISIN A PENGKODE BAKTERIOSIN PADA KELOMPOK *Lactobacillus casei*

SKRIPSI

Oleh:
SALMA AINU NISA
NIM. 17620083

Telah Diperiksa dan Disetujui:
Tanggal: 30 November 2021

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
Dr. Nur Kusmiyati, M. Si	Dr. M. Mukhlis Fahruddin, M.S.I
NIP. 19890816 2016080 1 2061	NIPT. 201402011409

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

ii

DETEKSI GEN PLANTARISIN A PENGKODE BAKTERIOSIN PADA KELOMPOK *Lactobacillus casei*

SKRIPSI

Oleh:
SALMA AINU NISA
NIM. 17620083

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal: 13 Desember 2021

Penguji Utama	**Prof. Dr. Ulfah Utami, M. Si** **NIP. 19650509 199903 2 002**	
Ketua Penguji	**Ir. Liliek Harianie A.R., M.P** **NIP. 19620901 199803 2 001**	
Sekretaris Penguji	**Dr. Nur Kusmiyati, M. Si** **NIP. 19890816 2016080 1 2061**	
Anggota Penguji	**Dr. M. Mukhlis Fahruddin, M.S.I** **NIPT. 201402011409**	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas nikmat dan karunianya, sehingga saya mampu menyelesaikan skripsi ini. Semoga senantiasa Engkau berikan keberkahan atas ilmu yang didapatkan, dan senantiasa Engkau jadikan ini sebagai jembatan untuk keberkahan-keberkahan yang lain. Sholawat dan salam senantiasa atas junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang selalu kami tunggu syafaatnya. Karya ini saya persembahkan kepada orang-orang yang telah berjasa hingga saya bisa menyelesaikan skripsi.

1. Kedua orang tua saya, bapak Mukosim dan ibu Winaryati terimakasih atas segala doa dan dukungan baik secara moral maupun materi yang telah diberikan sehingga dapat mengantarkan saya mencapai tahap ini.
2. Kedua adik saya, Ilyasa Ainu Adzim dan Khalida Ainu Rahma yang juga selalu memberi semangat dan dukungan

Semoga Allah membalas atas segala yang telah diberikan dengan kebaikan yang bekali lipat. Semoga karya ini bermanfaat untuk saya dan orang lain. Aamiin ya rabbal aalamiin.

Malang, 24 Desember 2021

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	:	Salma Ainu Nisa
NIM	:	17620083
Program Studi	:	Biologi
Fakultas	:	Sains dan Teknologi
Judul Penelitian	:	Deteksi Gen *Plantarisin A* Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, dan/atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan dan/atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 24 Desember 2021
yang membuat pernyataan,

METERAI TEMPEL
B3353AJX554877900

Salma Ainu Nisa
NIM. 17620083

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Deteksi Gen Plantarisin A Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*

Salma Ainu Nisa, Nur Kusmiyati, M. Mukhlis Fahruddin

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Gen plantarisin A (*plnA*) adalah gen pengkode peptida feromon yang berfungsi menginduksi produksi bakteriosin pada *Lactobacillus plantarum*. Namun, diduga ada peptida yang secara fungsional mirip dengan *plnA* terdeteksi pada bakteri asam laktat (BAL) penghasil bakteriosin lainnya. Kelompok *Lactobacillus casei* terdiri dari *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei,* dan *Lactobacillus rhamnosus*, merupakan spesies BAL yang paling sering diteliti dan diterapkan secara luas sebagai probiotik terkait produksi zat antimikrobanya termasuk bakteriosin. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui adanya gen *plnA* sebagai pengkode bakteriosin pada kelompok *L. casei*. Deteksi gen *plnA* dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu pembuatan kultur bakteri, ampifikasi PCR dengan menggunakan primer spesifik *plnA*-F dan *plnA*-R, dan elektroforesis produk PCR. Hasil positif elektroforesis produk PCR yang ditunjukkan dengan munculnya pita DNA dilakukan sekuensing. Sekuens DNA gen *plnA* hasil sekuensing selanjutnya digunakan untuk analisis BLAST. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan gen *plnA* ditemukan pada *L. casei* dan *L. paracasei*, namun tidak ditemukan pada *L. rhamnosus*. Analisis BLAST sekuens DNA gen *plnA* dari *L. casei* dan *L. paracasei* memiliki kesamaan dengan sekuens DNA gen *plnA L. plantarum* strain EG.LP.18.7 yang tersimpan di GenBank masing-masing sebesar 99,56% dan 100%. Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa gen *plnA* yang ditemukan pada *L. casei* dan *L. paracasei* memproduksi bakteriosin sebagai zat antimikroba.

Kata kunci: antimikroba, bakteriosin, gen *plnA*, kelompok *L. casei*

Detection of Plantaricin A Gene that Encoding Bacteriocin in *Lactobacillus casei* group

Salma Ainu Nisa, Nur Kusmiyati, M. Mukhlis Fahruddin

Biology Program Study, Faculty of Science and Technology, The State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

The plantaricin A (plnA) as a gene that encodes pheromone peptide could induce bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. Nevertheless, it has been detected several peptides that functionally similar to PlnA in the other bacteriocin-producing lactic acid bacteria. The *Lactobacillus casei* group, composed of the closely related *Lactobacilus casei*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* are the most widely researched and applied probiotic spesies related to the production of antimicrobial substances including bacteriocins. This study aimed to detect plnA gene that encode bacteriocin production in *L. casei* group. Detection of the plnA gene was carried out in several steps, such as making the bacterial cultures, PCR amplification using plnA-F and plnA-R spesific primer, electrophoresis of PCR product. In addition, positive results of electrophoresis of PCR product indicated by appearance of DNA bands were sequencing. The DNA sequences of plnA gen were used for BLAST analysis. Based on the results obtained, plnA gene was found in *L. casei* and *L. paracasei*, but not found in *L. rhamnosus*. BLAST analysis showed the DNA sequences of plnA in *L. casei* and *L. paracasei* had similarities with *L. plantarum* strain EG.LP.18.7 deposited in GenBank by 99.56% and 100% respectively. It was concluded that the plnA gene found in *L. casei* and *L. paracasei* produce bacteriocin as antimicrobial subtance.

Keywords: antimicrobial, bacteriocin, *L. casei* group, plnA gene

الكشف عن الجين المشفر(Plantarisin A) بلانتارسين A الجين البكتيريوسين في مجموعة *Lactobacillus casei*

سلمى عينو نيسا ، نور قشمياتي ، محمد مخلص فخر الدين

برنامج دراسة الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، مولانا مالك إبراهيم الدولة الإسلامية جامعة مالانج

ملخص البحث

إن جين plantarisin A (plnA) هو جين يقوم بترميز الببتيد الفرمون الذي يعمل على تحفيز إنتاج البكتريوسينات في *Lactobacillus plantarum*. ومع ذلك ، يشتبه في أنه تم اكتشاف ببتيد مشابه وظيفيًا لـ plnA في بكتيريا حمض اللاكتيك الأخرى المنتجة للبكتيريا (LAB). مجموعة *Lactobacillus casei* ، التي تتكون من *Lactobacillus casei* ، و *Lactobacillus paracasei* ، و *Lactobacillus rhamnosus* ، هي أكثر أنواع LAB التي تمت دراستها بشكل متكرر وتطبيقها على نطاق واسع باعتبارها بروبيوتيك ذات صلة بإنتاج المواد المضادة للميكروبات بما في ذلك البكتيريا. كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد وجود جين plnA باعتباره ترميز جرثومي في مجموعة L. casei.تم إجراء اكتشاف الجين plnA على عدة مراحل ، وهي تصنيع المزارع البكتيرية ، وتضخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل باستخدام بادئات محددة plnA-F و plnA-R ، والرحلان الكهربائي لمنتجات PCR.النتائج الإيجابية للرحلان الكهربي لمنتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل المشار إليها بظهور عصابات الحمض النووي كانت عبارة عن تسلسل. ثم تم استخدام تسلسل الحمض النووي لتسلسل الجين plnA لتحليل بلاست. أظهرت النتائج أنه تم العثور على جين plnA في *L. casei* و *L. paracasei* ولكن ليس في *L. rhamnosus*. تحليل بلاست لتسلسل الحمض النووي للجين plnA من *L. casei* و *L. paracasei* له أوجه تشابه مع متواليات DNA لجين plnA سلالة *L.plantarum* EG.LP.18.7 المخزنة في GenBank بنسبة 99.56٪ و 100٪ على التوالي. الاستنتاج من نتائج هذه الدراسة هو أن جين plnA الموجود في *L. casei* و *L. paracasei* ينتج البكتريوسين كعامل مضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: مضاد للميكروبات ، جرثومي ، جين plnA ، مجموعة *L. casei*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan-Nya sehingga skripsi dengan judul " Deteksi Gen Plantarisin A Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*" dapat terselesaikan dengan baik. Shalawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing manusia ke jalan yang benar.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berperan dalam penyelesaian skripsi ini, yaitu:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Evika Sandi Savitri M. P sekaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Dr. Nur Kusmiyati, M.Si selaku dosen pembimbing skripsi bidang biologi serta Mukhlis Fachruddin, M.SI selaku dosen pembimbing skripsi bidang Integrasi Sains dalam Islam yang telah memberikan arahan, bimbingan, dan waktunya untuk memberikan bimbingan kepada penulis
5. Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si dan Ir. Liliek Harianie AR, M.P selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik
6. Seluruh dosen, laboran, serta staf jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
7. Kedua orang tua penulis yang tidak berhenti memberikan doa, motivasi, dan dukungan dalam segala bentuk kepada penulis
8. Tim riset kelompok *Lactobacillus casei* (Verianika Nugrahini, Cici Rafita Sari, Yuni Puspitasari), terimakasih atas semangat, dukungan, dan kerja samanya selama pengerjaan skripsi ini

9. Seluruh pihak dan teman-teman lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah memberikan semangat dan dukungan hingga skripsi ini bisa terselesaikan

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan mereka semua. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca umumnya. Aamiin ya rabbal aalamiin.

Malang, 24 Desember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN ii
HALAMAN PENGESAHAN iii
HALAMAN PERSEMBAHAN iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI vi
ABSTRAK vii
ABSTRACT viii
ملخص البحث ix
KATA PENGANTAR x
DAFTAR ISI xii
DAFTAR TABEL xiv
DAFTAR GAMBAR xv
DAFTAR LAMPIRAN xvi

BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 7
1.3 Tujuan Penelitian 7
1.4 Manfaat Penelitian 7
1.5 Batasan Masalah 8

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Kelompok *Lactobacillus casei* 9
2.2 Bakteriosin 16
2.3 Klasifikasi Bakteriosin 18
2.4 Biosintesis Bakteriosin 22
2.5 Mekanisme Kerja Bakteriosin 24

2.6 Aplikasi Bakteriosin 26
2.7 Gen Plantarisin A 30
2.8 Gen Pengkode Bakteriosin..... 32

BAB III METODE PENELITIAN
3.1 Rancangan Penelitian 34
3.2 Waktu danTempat 34
3.3 Alat dan Bahan 34
3.4 Prosedur Penelitian 35
3.5 Analisis Data 39

BAB IV Hasil dan Pembahasan
4.1 Amplifikasi PCR Gen Plantarisin A 40
4.2 Hasil Sekuensing 45

BAB V PENUTUP
5.1 Kesimpulan 51
5.2 Saran 51

DAFTAR PUSTAKA 52
LAMPIRAN 61

DAFTAR TABEL

Tabel halaman

4.1 Hasil BLAST sekuens DNA gen *plnA L. casei* dan *L. paracasei* 47

DAFTAR GAMBAR

Gambar halaman

2.1 Mekanisme sisntesis bakteriosin 23
2.2 Mekanisme sintesis bakteriosin melalui quorum sensing 24
2.3 Mekanisme kerja bakteriosin 25
2.4 Kelompok gen pengkode biosintesis plantarisin 30
4.1 Visualisasi hasil amplifikasi PCR gen *plnA* pada gel agarose..... 41
4.2 Hasil sekuensing gen *plnA* pada *L. casei* dan *L. paracasei* 46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Formula Pembuatan Buffer TE pH 8 61
Lampiran 2 Hasil Pertumbuhan Kelompok *L. casei* di MRSB 62
Lampiran 3 Hasil Sekuensing *L. casei*..... 63
Lampiran 4 Hasil Sekuensing *L. paracasei* 64
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian..... 65
Lampiran 6 Bukti Konsultasi Pembimbing Biologi 67
Lampiran 6 Bukti Konsultasi Pembimbing Biologi 68

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pembusukan makanan oleh mikroba masih menjadi permasalahan besar dalam industri makanan (Odeyemi *et al*., 2020). Mikroba pembusuk berdampak negatif pada masa simpan, karakteristik tekstur, kualitas produk, dan mengakibatkan kerugian ekonomi yang signifikan (Bondi *et al*., 2017). Menurut Kumar & Kalita (2017) diperkirakan sebanyak sepertiga (sekitar 1,3 miliar ton) dari total produksi makanan, terbuang secara global setiap tahun karena aktivitas mikroba pembusuk. Pemberian bahan kimia tambahan telah banyak digunakan oleh industri makanan untuk menekan perkembangan mikroba pembusuk dan memperpanjang masa simpan makanan (Kourkoutas & Proestos, 2020). Namun bahan kimia sebagai pengawet makanan dapat bersifat toksik dan menimbulkan efek negatif pada tubuh (Hilda, 2015).

Allah SWT berfirman dalam Q.S Al-Baqarah ayat 168 sebagai berikut:

يٰٓاَيُّهَا النَّاسُ كُلُوْا مِمَّا فِى الْاَرْضِ حَلٰلًا طَيِّبًاۖ وَّلَا تَتَّبِعُوْا خُطُوٰتِ الشَّيْطٰنِۗ اِنَّهٗ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِيْنٌ ١٦٨

Terjemah Kemenag (2019): “Wahai manusia, makanlah sebagian (makanan) di bumi yang halal lagi baik dan janganlah mengikuti langkah-langkah setan. Sesungguhnya ia bagimu merupakan musuh yang nyata”.

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah, ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menganjurkan untuk makan dari makanan yang halal, yaitu makanan yang tidak haram, baik zatnya maupun cara memperolehnya. Selain halal, makanan juga harus yang baik, yaitu sehat, aman, dan tidak berlebihan. *Halalan*

thayyiban merupakan sebuah konsep tentang makanan yang harus diamalkan manusia pada umumnya dan ummat Islam pada khususnya. Menurut Mulizar (2016), berdasarkan tafsir Al-Azhar kata *halal* ukurannya adalah sesuatu selain yang diharamkan, sedangkan *thayyib* "baik" pendekatannya adalah medis/kesehatan, yaitu tidak memberi mudharat bagi badan dan akal. Penafsiran yang dapat dipahami bahwa makanan yang baik adalah memenuhi standar kesehatan, yaitu yang mengadung gizi dan tidak memudharatkan. Penegasan Al-Quran yang menggunakan kalimat *halalan thayyiban*, menunjukkan suatu makanan harus memperhatikan yang halal dan thayyib.

Keamanan dan mutu pangan merupakan perihal utama dalam industri makanan. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia makanan ialah menggunakan bahan alami yang berasal dari tumbuhan, hewan atau mikroba untuk pengawetan makanan (Afriani *et al.*, 2017). Pengawetan menggunakan bahan alami /biopreservasi sangat potensial untuk diterapkan pada produk pangan karena mampu mengontrol pertumbuhan mikroba pembusuk makanan secara alami. Kelebihan dari biopreservasi dibandingkan dengan penggunaan pengawet kimia seperti manfaat organoleptik, nutrisi, dan kesehatan (Kourkoutas & Proestos, 2020).

Beberapa tahun terakhir mulai banyak dikembangkan zat antimikroba alami yang berasal dari mikroba. Banyak bakteri asam laktat (BAL) termasuk anggota genus Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, dan Pediococcus telah digunakan sebagai biopreservatif alami yang mampu bertindak melawan berbagai bakteri pembusuk makanan dan patogen seperti *Salmonella enteritidis*, *Eschericia coli*,

Listeria monocytogenes, *Clostridium perfringenes*, dan *Bacillus cereus* sehingga meningkatkan umur simpan produk makanan (Thakur, 2017).

Lactobacillus merupakan salah satu probiotik golongan BAL yang paling terkenal dan telah tercatat menjadi tambahan yang bernilai pada makanan, serta berpotensi meningkatkan kesehatan (Naeem *et al*., 2012). Menurut Hill *et al*. (2018), *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei,* dan *Lactobacillus rhamnosus* merupakan kelompok *Lactobacillus casei* yang paling sering diteliti dan diterapkan secara luas sebagai probiotik. *L. casei*, *L. paracasei*, dan *L. rhamnosus* berhubungan erat secara filogenetik dan fenotip, sehingga secara bersama ketiganya dianggap sebagai kelompok *L. casei* (Huang *et al*., 2018). Potensi probiotik kelompok *L. casei* dalam memberikan manfaat kesehatan bagi inang sering dikaitkan dengan produksi zat antimikroba seperti asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Hill *et al*., 2018).

Produksi zat antimikroba yang mampu melawan bakteri patogen merupakan salah satu karakteristik yang penting dari kelompok *L. casei* sebagai probiotik. Nisa' (2020) menyebutkan bahwa kelompok *L. casei* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*. Iseppi *et al*. (2019) melaporkan bahwa zat antimikroba dari *L. paracasei* mampu menghambat bakteri *S. aureus* dan *L. monocytogenes*. Maulidayanti & Mubarik (2019) juga melaporkan bahwa zat antimikroba yang diproduksi oleh *L. rhamnosus* mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella typhymurium* dan *L. monocytogenes*.

Bakteriosin didefinisikan sebagai peptida antimikroba yang disintesis oleh ribosom dan dapat dilepaskan secara ekstraseluler (Tai *et al*., 2015). Bakteriosin

memiliki aktivitas bakteriostatik maupun bakterisida terhadap berbagai jenis bakteri dan seringkali paling aktif melawan bakteri yang terkait erat dengan strain penghasil (Heeney *et al*., 2019). Pemakaian bakteriosin sudah dilakukan di beberapa negara untuk menekan perkembangan mikroba pembusuk makanan (Bondi *et al.*, 2017) dan patogen sehingga diaplikasikan sebagai pengawet makanan alami (Chikindas *et al*., 2018). El-Arabi (2018) menyebutkan bahwa bakteriosin dapat diproduksi oleh berbagai spesies bakteri dan bakteriosin yang diproduksi oleh beberapa spesies bakteri asam laktat (BAL) memiliki potensi yang baik dalam mengontrol mikroba pembusuk makanan.

Sejumlah besar bakteriosin dari BAL yang telah dilakukan purifikasi dan karakterisasi seperti nisin dari *Lactococcus lactis*, pediosin dari *Pediococcus acidilactici*, sakasin dari *Lactobacillus sakei*, asidosin dari *Lactobacillus acidophilus*, plantarisin dari *Lactobacillus plantarum*, gasserin dari *Lactobacillus gasseri*, dan kurvasin dari *Lactobacillus curvatus* (Ma *et al*., 2020). Genus Lactobacillus menjadi sumber terbanyak penghasil bakteriosin yang berbeda dalam beberapa aspek seperti cara kerja, asal genetik, dan sifat biokimia (Bibalan *et al*., 2017). Refay *et al*. (2020) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa diduga ada hubungannya lingkungan tempat diisolasinya BAL dengan bakteriosin yang diproduksi. Faktor lingkungan tidak hanya dapat mengontrol keanekaragaman hayati strain BAL tetapi juga distribusi gen penyandi bakteriosin. Sehingga menurut Collins *et al*. (2017) gen penyandi bakteriosin pada Lactobacillus dapat diprediksi dari gen yang telah ditemukan pada genus Lactobacillus sebelumnya.

Salah satu bakteriosin dari genus Lactobacillus yang telah dipelajari secara luas dan berkembang pesat dengan beragam penerapannya adalah plantarisin yang dihasilkan *L. plantarum*. Bakteriosin plantarisin dilaporkan sebagai bakteriosin yang memiliki aktivitas penghambatan yang luas, stabil terhadap panas, dan stabil pada pH asam sampai basa (Ahmad *et al*., 2017). Sehingga bakteriosin plantarisin mendapatkan perhatian khusus terkait kemampuannya dalam menghambat atau membunuh bakteri patogen, dan potensi aplikasinya sebagai biopreservatif makanan (Syaputri & Iwahashi, 2020). Menurut Čanak *et al.* (2018) plantarisin telah diaplikasikan untuk biopreservasi pada ikan segar, memperpanjang umur simpan makanan tanpa mengubah nutrisi produk, dan packaging film antimikroba untuk daging segar.

Bakteriosin dalam produksinya diatur secara genetik oleh sekelompok operon. Bakteriosin dari *L. plantarum* yang umumnya dikenal sebagai plantarisin dikodekan oleh beberapa gen plantarisin (*pln*) telah dikarakterisasi secara genetik (Tai *et al*., 2015). Gen tersebut tersusun dari gen *plnA* (peptida feromon), *plnB* (histidin kinase), *plnC* dan *plnD* (respon regulator), *plnE* dan *plnF* (bakteriosin dua peptida). Pada mekanismenya peptida feromon yang dihasilkan akan berinteraksi dengan histidin kinase. Histidin kinase aktif untuk memfosforilasi respon regulator, kemudian merangsang transkripsi gen target bakteriosin dua peptida (Kareb & Aïder, 2020).

Sand *et al*. (2013) menjelaskan bahwa gen *plnA* pada dasarnya adalah gen pengkode peptida feromon yang menginduksi produksi bakteriosin dua peptida. Namun, gen *plnA* juga secara langsung mengkode bakteriosin yang memiliki

aktivitas antimikroba. Kehadiran gen *plnA* menunjukkan gen ini merupakan ciri umum dari regulasi biosintesis bakteriosin plantarisin. Hampir semua strain dari *L. plantarum* mengandung gen penyandi plantarisin A (*plnA*) (Rizzello *et al*., 2014). Deteksi gen *plnA* menggunakan primer spesifik *plnA* F (5'-GTACAGTACTAATGGGAG-3') dan R (5'-CTTACGCCAATCTATACG-3') telah berhasil digunakan untuk memdeteksi gen pengkode plantarisin pada *L. plantarum* (Basa *et al*., 2020; El Issaoui *et al*., 2021). Hasil penelitian Soegandi *et al*. (2019) deteksi gen *plnA* dengan primer spesifik *plnA* dapat ditemukan pada semua strain *L. plantarum* yang berhasil diisolasi dari berbagai makanan fermentasi.

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dengan menggunakan kelompok *L. casei* yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *S. aureus* (Nisa', 2020). Analisis gen *plnA* pengkode bakteriosin pada kelompok *L. casei* masih belum banyak dipublikasikan. Rizzello *et al.* (2014) mengatakan bahwa ada peptida yang secara fungsional mirip dengan *plnA* terdeteksi pada bakteri asam laktat penghasil bakteriosin lainnya. Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan adanya kedekatan antara kelompok *L. casei* dengan *L. plantarum* (Salvetti *et al*., 2012). Hal ini menimbulkan dugaan adanya kesamaan gen *plnA* terdapat pada keduanya.

Bakteriosin memiliki potensi yang besar untuk industri makanan sebagai pengawet makanan. Namun, produksi bakteriosin umumnya rendah pada galur liar. Mengetahui gen pengkode bakteriosin perlu dilakukan untuk meningkatkan produksi bakteriosin. Banyak penelitian telah melakukan studi tentang produksi

bakteriosin dengan ekspresi gen menggunakan genetika rekombinan pada *E. coli*, khamir, dan sintesis bahan kimia (Cui *et al*., 2021). Sehingga perlu untuk mengeksplorasi keberadaan gen *plnA* sebagai pengkode bakteriosin dari kelompok *L. casei* ini.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini memiliki rumusan masalah apakah kelompok *L. casei* memiliki gen *plantarisin* A sebagai pengkode bakteriosin?.

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya gen *plantarisin A* sebagai pengkode bakteriosin pada kelompok *L. casei*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diantaranya, adalah

1. Penelitian ini memberikan informasi mengenai adanya gen *plantarisin A* yang mengkode bakteriosin pada kelompok *L. casei*
2. Penelitian ini dapat menjadi pertimbangan untuk penelitian lanjutan mengenai potensi gen *plantarisin A* pengkode bakteriosin dari kelompok *L. casei* dalam bidang industri makanan dan kesehatan.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini, adalah

1. Kelompok *L. casei* yang digunakan dalam penelitian terdiri dari *L. casei, L. paracasei,* dan *L. rhamnosus* yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus* (Nisa', 2020)
2. Deteksi gen *plantarisin A* pengkode bakteriosin dilakukan menggunakan amplifikasi PCR berdasarkan primer spesifik *plnA* F (5'-GTACAGTACTAATGGGAG-3') dan R (5'-CTTACGCCAATCTATACG-3') dengan produk amplifikasi ± 450 bp (Basa *et al*., 2020; El Issaoui *et al*., 2021)
3. Sekuens DNA dianalisis tingkat kesamaannya dengan data sekuens yang sudah tersimpan di GenBank melalui web server BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelompok *Lactobacillus casei*

Kelompok *L. casei* merupakan beberapa di antara spesies Lactobacillus yang paling banyak diteliti dan diterapkan sebagai probiotik. Secara komersial kelompok *L. casei* telah digunakan untuk memfermentasi produk susu dan menghasilkan makanan dengan rasa dan tekstur yang lebih baik. Selain itu, metabolit bioaktif seperti asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Hajigholizadeh *et al*., 2020) yang dihasilkan dapat memberikan manfaat pada inang apabila dikonsumsi. Pada beberapa tahun terakhir banyak penelitian telah difokuskan pada penerapannya untuk promosi kesehatan dalam pengobatan atau pencegahan sejumlah penyakit. Potensinya dapat digunakan secara terapeutik pada penyakit yang berhubungan dengan gangguan mikrobiota usus (Hill *et al*., 2018).

Kelompok *L. casei* terdiri dari spesies *L. casei*, *L. paracasei*, dan *L. rhamnosus*, adalah salah satu kelompok yang paling menarik secara ekonomis di dalam genus Lactobacillus (Wuyts *et al*., 2017). *L. casei*, *L. paracasei*, dan *L. rhamnosus* berhubungan erat secara filogenetik dan fenotipik sehingga secara bersama-sama dianggap sebagai kelompok *L. casei*. Anggota kelompok ini merupakan heterofermentatif fakultatif, memiliki kandungan DNA G + C 45-47 mol%, dan memiliki jenis peptidoglikan identik (L-Lys-DAsp). Karena spesies dari kelompok *L. casei* memiliki nilai komersial cukup besar, membedakan ketiga anggota dari kelompok ini penting dilakukan untuk menghindari kebingungan di

antara strain probiotik yang terkait dalam makanan dan produk yang berhubungan dengan kesehatan (Huang *et al*., 2018).

Status taksonomi dari kelompok *L. casei* seperti halnya nomenklaturnya telah berubah berkali-kali. Metode taksonomi yang digunakan tidak memadai menyebabkan spesies diberi label yang salah. Daftar nama bakteri yang disetujui (Skerman *et al*., 1980), berdasarkan karakteristik fenotipik *L. casei* dikatakan sebagai spesies tunggal dengan lima subspesies, yaitu *L. casei* subsp. casei, *L. casei* subsp. alactosus, *L. casei* subsp. pseudoplantarum, *L. casei* subsp. tolerans, dan *L. casei* subsp. rhamnosus. Collins *et al*. (1989), berdasarkan homologi DNA direklasifikasi menjadi tiga spesies dan dua subspesies, yaitu (i) *L. casei* (sebelumnya *L. casei* subsp. casei); (ii) *L. paracasei* terdiri dari dua subspecies, *L. paracasei* subsp. paracasei (sebelumya subspecies *L. casei* subsp. alactosus dan *L. casei* subsp. pseudoplantarum) dan *L. paracasei* subsp. tolerans (sebelumnya subspesies *L. casei* subsp. tolerans); dan (iii) *L. rhamnosus* (sebelumnya subspesies *L.casei* subsp. rhamnosus) (Huang *et al*., 2018).

Taksonomi konvensional berdasarkan sifat morfologis, fisiologis, dan biokimia menunjukkan banyak karakteristik yang sama dari masing-masing anggota kelompok *L. casei* sehingga menghasilkan fenotipe yang sangat mirip. Banyak analisis dari isolat-isolat baru diklasifikasikan sebagai *L. casei* dan *L. paracasei* sementara pada kenyataannya termasuk anggota dari spesies yang sama (Wuyts *et al*., 2017). Analisis molekuler dengan 16S rRNA umum digunakan untuk identifikasi dan diferensiasi spesies. Subunit 16S dari ribosom bakteri mengandung urutan yang dilestarikan di antara bakteri, memungkinkan identifikasi spesies

berdasarkan kesamaan urutan untuk menghindari metode fenotopik yang berpotensi membingungkan. Namun, analisis 16S rRNA juga tidak selalu dapat diandalkan untuk spesies kelompok *L. casei* karena tingginya similiaritas sekuens dari ketiga spesies (Hill *et al*., 2018).

Metode fenotipik konvensional dan genotipik seringkali sulit digunakan untuk membedakan ketiga spesies dan oleh karena itu metode baru terus dikembangkan untuk membedakan ketiga spesies yang berkerabat dekat tersebut. Menurut Huang *et al*. (2018) metode taksonomi molekuler seperti RAPD-PCR dan *temporal temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE) telah diterapkan untuk identifikasi kelompok *L. casei*. Saat ini meningkatnya *Whole genome sequence* (WGS) yang tersedia secara publik (210 anggota kelompok *L. casei* per Februari 2017) memberi wawasan mendalam tentang perbedaan genetik dan taksonomi kelompok *L. casei*.

Spesies kelompok *L. casei* dapat ditemukan di berbagai habitat, digunakan di berbagai produk makanan dalam industri makanan. Kelompok ini telah diisolasi dari berbagai lingkungan termasuk makanan fermentasi, terutama keju dari mana nama *casei* berasal. Pada jenis keju yang berbeda, kelompok ini dapat hadir secara alami ataupun ditambahkan sebagai starter atau kultur tambahan. Umumnya kelompok *L. casei* adalah spesies yang dominan sebagai non-starter pada keju umur matang (Bottari *et al*., 2017). Strain *L. casei* Shirota dan *L. rhamnosus* GG merupakan strain probiotik dari kelompok *L. casei* yang telah dikenal luas di seluruh dunia penggunaannya dalam produk susu fermentasi, suplemen makanan atau sebagai probiotik untuk meningkatkan kesehatan tubuh (Huang *et al*., 2018).

2.1.1 *Lactobacillus casei*

L. casei adalah spesies BAL dari genus Lactobacillus yang paling umum digunakan sebagai probiotik. Anggota dari genus Lactobacillus merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, non-motil, non-sporulasi, dan katalase negatif (Mahato & Shahani, 2019). *L. casei* disebut probiotik karena bermanfaat mendukung respon sistem imun, kesehatan sel, dan meningkatkan bakteri baik di dalam usus. Selain itu, *L. casei* merupakan BAL yang berpotensi sebagai biopresevatif karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan perusak (Azizah *et al*., 2018). *L. casei* mendiami beragam habitat lingkungan seperti keju, anggur, acar, saluran reproduksi, dan pencernaan manusia maupun hewan (Aktas *et al*., 2016). *L. casei* dikategorikan ke dalam BAL fakultatif heterofermentatif (Ehsani *et al*., 2018). BAL ini juga memproduksi etanol/asetat dan CO^2 selain asam laktat sebagai hasil dari fermentasi glukosa (Hatti-Kaul *et al*., 2018). Zheng *et al*., (2020) berdasarkan reklasifikasi terbaru kelompok *L. casei* termasuk dalam genus Lacticaseibacillus. Klasifikasi *Lactobacillus casei* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Lactobacillales

Family : Lactobacillaceae

Genus : Lacticaseibacillus

Species : *Lacticaseibacillus casei*

L. casei dapat hidup dengan baik pada suhu optimum 15 – 41 °C dan pH 3,5. Bakteri homofermentatif ini memiliki suhu pertumbuhan minimum 10 °C, maksimum 40 °C dan optimum 30 °C (Sekarningrum & Umar, 2020). Menurut Sunaryanto *et al*. (2014) *L. casei* mampu hidup hingga konsentrasi garam empedu 15%, dan mampu bertahan pada media asam hingga pH 2. Pada saat ini, strain *L. casei* digunakan manusia untuk mengurangi risiko infeksi gastrointestinal (GI) termasuk peningkatan kesehatan usus dengan regulasi mikrobiota. Hal tersebut merupakan kepentingan klinis yang utama dalam penerapan probiotik (Nagpal *et al*., 2012). *L. casei* menghasilkan komponen antibakteri (bakteriosin) yang dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen. Komponen antibakteri yang dihasilkan merupakan keunggulannya sebagai probiotik untuk menghilangkan pesaing dan menjaga keseimbangan mikrobiota usus (Hayati *et al*., 2018). Kemampuan *L. casei* untuk bertahan dalam sistem pencernaan dan berpotensi menjajah usus memungkinkan memiliki efek langsung pada kesehatan manusia. Minat dalam memanfaatkan probiotik untuk pengobatan atau pencegahan penyakit semakin meningkat (Hill *et al*., 2018).

2.1.2 *Lactobacilus paracasei*

L. paracasei adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, anaerob fakultatif, dan bersifat heterofermentatif fakultatif (Diza *et al*., 2020). *L. paracasei* merupakan BAL yang termasuk ke dalam kelompok *L. casei.* Tatanama *L. casei* dan *L. paracasei* telah menjadi bahan perdebatan yang luas. Sebagian besar strain yang ditunjuk sebagai *L. casei* atau *L. paracasei* adalah anggota dari spesies yang sama dan biasanya harus diberi nama *L. paracasei* subsp.

paracasei mengikuti nomenklatur yang berlaku saat ini (Smokvina *et al*., 2013). Klasifikasi *L. paracasei* menurut Zheng *et al*. (2020) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Lactobacillales

Family : Lactobacillaceae

Genus : Lacticaseibacillus

Species : *Lacticaseibacillus paracasei*

L. paracasei merupakan anggota dari mikrobiota normal saluran usus manusia dan digunakan secara luas dalam industri makanan dalam kultur starter untuk produk susu dan juga sebagai bakteri dengan fitur probiotik (Smokvina *et al*., 2013). Strain *L. paracasei* juga ditemukan secara alami dalam fermentasi sayuran, susu, dan daging (Diza *et al*., 2020). Strain spesies ini biasa digunakan dalam banyak produk susu probiotik, seperti yogurt, keju, dan susu fermentasi (Guerra *et al.*, 2018).

Strain *L. paracasei* yang digunakan dalam produk susu telah dipelajari sebelumnya secara klinis nilai keuntungannya. Strain spesies ini memiliki kemampuan untuk menghidrolisis pati mentah untuk menghasilkan karbohidrat sederhana, termasuk glukosa dan asam laktat (Zhang *et al*., 2017). Kemampuannya mengikat dan memanfaatkan karbohidrat adalah penting untuk kolonisasi usus dan promosi dari metabolisme karbohidrat. Hal tersebut menjadikan sumber karbon tambahan dihasilkan untuk pertumbuhan kompetitif mikroflora usus, yang

menguntungkan pertumbuhan kompetitif BAL di saluran usus (Xu *et al*., 2019). Keseimbangan dari mikrobiota usus sangat penting untuk perkembangan normal dan fungsi sistem kekebalan tubuh. *L. paracasei* telah menunjukkan potensinya sebagai kandidat probiotik melalui kemampuannya menurunkan sekresi sitokin pro-inflamasi, meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi (Choi *et al*., 2020).

2.1.3 *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus merupakan bakteri anaerob fakultatif heterofermentatif berbentuk batang yang dapat hidup di berbagai bagian tubuh manusia, termasuk di saluran pencernaan manusia dan juga di saluran vagina (Martín *et al*., 2019). Bakteri ini merupakan bakteri Gram positif yang diidentifikasikan sebagai jenis probiotik dikarenakan bakteri ini dapat bertahan terhadap cairan asam lambung dan empedu, serta dapat menempel (adhesi) di lapisan epitel usus (Deswindra *et al*., 2018). *L. rhamnosus* mampu menghasilkan biofilm yang secara mekanis dapat melindungi mukosa dan berbagai faktor terlarut yang bermanfaat bagi usus. *L. rhamnosus* juga memiliki asam organik yang mampu menghambat beerapa bakteri patogen seperti spesies Salmonella (Capurso, 2019). Klasifikasi *Lactobacillus rhamnosus* menurut Zheng *et al*. (2020) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Lactobacillales

Family : Lactobacillaceae

Genus : Lacticaseibacillus

Species : *Lacticaseibacillus rhamnosus*

L. rhamnosus adalah bakteri asam laktat yang ditemukan di berbagai habitat ekologis, termasuk produk susu artisanal dan industri, rongga mulut, saluran usus atau vagina. *L. rhamnosus* memiliki keragaman fenotipik dan genomik yang luas. Sebanyak 100 strain *L. rhamnosus* dapat diisolasi dari spektrum relung ekologi yang luas (Douillard *et al*., 2013). *L. rhamnosus* GG (LGG) merupakan strain pertama yang masuk dalam genus Lactobacillus. *L. rhamnosus* GG (LGG), awalnya diisolasi dari sampel tinja manusia dewasa yang sehat oleh Sherwood Gorbach dan Barry Goldwin, hal ini yang menjelaskan nama khasnya GG. Ini diidentifikasi sebagai strain probiotik potensial karena ketahanannya terhadap asam dan empedu, karakteristik pertumbuhan yang baik dan kapasitas adhesi ke lapisan epitel usus. Sejak itu, *L. rhamnosus* GG (LGG) telah menjadi salah satu strain probiotik yang paling banyak dipelajari dan digunakan dalam berbagai produk probiotik yang tersedia secara komersial (Segers & Lebeer, 2014).

2.2 Bakteriosin

Bakteriosin adalah peptida antimikroba kuat yang diproduksi oleh beberapa mikroorganisme termasuk BAL. Bakteriosin disintesis secara ribosomal sebagai metabolit primer dan dilepaskan ke dalam sitoplasma atau media ekstraseluler (Zhao *et al*., 2020). Bakteriosin termasuk molekul kationik kecil yang terdiri dari sekitar 30-60 asam amino, hidrofobik, berbeda dalam spektrum aktivitas, cara kerja, berat molekul (MW), asal genetik, dan sifat biokimia (Mora-Villalobos *et al*., 2020). Banyak sifat positif bakteriosin yang sangat menarik dan potensial untuk berbagai aplikasi. Sifat bakteriosin diketahui stabil pada berbagai pH dan suhu,

tidak berbahaya untuk mikroba usus, dan mudah dicerna oleh enzim pencernaan. Bakteriosin juga tidak berwarna, tidak berbau, tidak berasa, sehingga meningkatkan potensi kegunaannya (Negash & Tsehai, 2020). Karena itu, beberapa bakteriosin yang potensial untuk skala aplikasi industri mulai diisolasi dan dikarakterisasi. Sebagai pengawet makanan bakteriosin mampu bertahan pada perubahan keadaan dingin ataupun panas selama produksi. Hingga saat ini nisin dan pediosin merupakan bakteriosin yang telah disetujui *Food and Drug Administration* (FDA) (Mokoena, 2017).

Aktivitas antibakteri yang dihasilkan bakteriosin mirip dengan antibiotik, akan tetapi karakter dari kedua zat tersebut berbeda. Bakteriosin disintesis oleh ribosom sebagai metabolit primer yang sensitif terhadap enzim proteolitik dan relatif tidak beracun bagi sel eukariotik, sedangkan antibiotik merupakan metabolit sekunder yang relatif beracun bagi sel eukariotik termasuk manusia (Mulyawati *et al*., 2019). Bakteri menghasilkan metabolit primer selama fase lag dan berperan penting selama masa pertumbuhan aktif, sedangkan metabolit sekunder dihasilkan setelah pertumbuhan aktif yang perannya tidak vital bagi pertumbuhan bakteri seperti untuk pertahanan di ekosistemnya (Sharma *et al*., 2019). Meskipun peran bakteriosin juga terkait pertahanan, bakteriosin masih dikategorikan sebagai metabolit primer karena bakteriosin diproduksi hingga tengah fase pertumbuhan eksponensial dan aktivitasnya akan menurun pada akhir fase pertumbuhan eksponensial (Mulyawati *et al.*, 2019).

Bakteriosin memiliki spektrum penghambatan berbeda-beda dan karakteristik ini yang digunakan sebagai penghambat bakteri pembusuk makanan

(Zhao *et al*., 2020). Ada dua jenis bakteriosin menurut spektrum penghambatannya. Tipe pertama, bakteriosin dengan aktivitas penghambatannya melawan bakteri lain yang masih tergolong dalam spesies berkerabat dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin disebut bakteriosin spektrum sempit. Tipe kedua, bakteriosin yang aktivitas penghambatannya terhadap bakteri lain dari genus yang berbeda disebut bakteriosin spektrum luas. Sel bakteri yang menghasilkan bakteriosin resisten terhadap peptida antimikroba yang dihasilkan sendiri, karena dimediasi oleh protein imunitas spesifik yang diproduksi oleh sel inang (Juturu & Wu, 2018).

BAL yang memproduksi bakteriosin dapat melindungi diri dari toksinnya sendiri dengan ekspresi protein imunitas yang dikodekan dalam operon bakteriosin. Gen yang mengkode produksi bakteriosin dan imunitas umumnya diatur oleh kelompok operon dan lokasinya dapat terletak pada kromosom, transposon atau plasmid (Al-zaiadi *et al*., 2019). Secara khusus bakteriosin mengandung gen toksin (bakteriosin), gen imunitas (yang memberikan resistensi terhadap toksin yang dihasilkan) dan gen lisis (mengkode protein yang membantu pelepasan toksin dari sel) (Abdulkarim *et al*., 2020). Bakteriosin yang diproduksi BAL menjadi sangat penting karena potensi aplikasinya dalam industri makanan sebagai biopeservatif. Bakteriosin dapat bertindak melawan bakteri pembusukan makanan seperti *Clostridium perfrigenes*, *Salmonella enteridis*, *L. monocytogenes*, *E. Coli*, dan meningkatkan umur simpan produk makanan (Abdulhussain *et al*., 2019).

2.3 Klasifikasi Bakteriosin

Bakteriosin diklasifikasikan berdasarkan struktur utamanya, berat molekul, modifikasi pascatranslasi, dan karakteristik genetik. Klasifikasi terbaru mengatur

bakteriosin terbagi menjadi tiga kelas utama berdasarkan sifat struktural dan fisikokimianya (Negash & Tsehai, 2020).

2.3.1 Bakteriosin kelas I

Bakteriosin kelas I dikenal sebagai RiPPs (*Ribosomally Produced and Post-translationally modified Peptides*) yang disebut lantibiotik (peptida lationin mengandung antibiotik) (Field *et al*., 2018). Lantibiotik merupakan peptida berukuran kecil (<5kDa), tahan panas, dan mengalami modifikasi pascatranslasi tinggi. Kelas I mencakup semua peptida yang mengalami modifikasi enzimatik selama biosintesis dan karakteristik peptida yang terbentuk mengandung asam amino tidak biasa misalnya, lantionin, β metil-lationin. Modifikasi pascatranslasi tersebut berdampak pada struktur dan sifat-sifatnya (Alvarez-Sieiro *et al*., 2016).

Lantibiotik dibagi menjadi dua jenis berdasarkan muatannya, yaitu peptida linier (Tipe A) dan peptida globular (Tipe B) (da Silva Sabo *et al*., 2014). Tipe A-lantibiotik adalah bakteriosin memanjang, kationik, dan umumnya berperan mengganggu intregritas membran organisme target (Ahmad *et al*., 2017). Tipe A-lantibiotik bekerja membentuk pori-pori di membran sel dari organisme target sehingga menyebabkan depolarisasi membran sitoplasma target (Kaur & Kaur, 2015). Bakteriosin nisin termasuk salah satu dari anggota bakteriosin tipe ini. Bakteriosin nisin diproduksi oleh *Lactococcus lactis* adalah peptida antibakteri pertama dari bakteri asam laktat dan secara komersial telah diakui aman (GRAS). Nisin digunakan dalam biopreservasi, dan sediaan dari bakteriosin ini telah diterapkan secara komersial (Arqués *et al*., 2015). Tipe B-lantibiotik adalah peptida berbentuk globular, tidak bermuatan atau bermuatan negatif, dan bertindak

mengganggu reaksi enzimatik seluler seperti menghambat biosintesis dinding sel. Tipe B-lantibiotik mampu menghambat kerja enzim katalitik yang penting untuk kelangsungan dari kehidupan bakteri. Bakteriosin laktisin 481, sitolisin, dan salivarisin termasuk anggota dari tipe ini (Ahmad *et al*., 2017).

2.3.2 Bakteriosin kelas II

Bakteriosin kelas II merupakan bakteriosin non-lantibiotik berukuran <10 kDa dan stabil terhadap panas. Bakteriosin kelas II tidak mengandung lantionin yang artinya tidak mengalami modifikasi pascatranslasi dan tidak mengandung residu asam amino. Struktur yang dimiliki berupa heliks amfifilik, yang memungkinkan bakteriosin jenis ini masuk ke dalam membran sel target, menyebabkan depolarisasi, dan kematian organisme target (Kaur & Kaur, 2015). Gen yang mengkode produksi bakteriosin kelas II diatur di dalam kelompok operon dan biasanya terdiri dari gen struktural yang mengkode prepeptida, gen imunitas khusus, gen transporter ABC untuk translokasi melalui membran, dan aksesori gen protein untuk mengekspor bakteriosin. Bakteriosin kelas II juga menghasilkan faktor induksi yang mengaktifkan gen pengatur transkripsi. Faktor induksi ini merupakan bagian dari sinyal sistem transduksi yang bertanggung jawab untuk biosintesis bakteriosin kelas II (Mokoena, 2017).

Bakteriosin kelas II dibagi menjadi empat subkelas berdasarkan struktur dan modifikasinya, yaitu bakteriosin kelas IIa, IIb, IIc, IId. Bakteriosin kelas IIa merupakan peptida yang terdiri 35 sampai 50 asam amino dan mengandung urutan sekuens asam amino Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys di daerah N-terminal. Bakteriosin ini memiliki aktivitas yang kuat melawan *L. monocytogenes*, yaitu

berbagai bakteri penyebab listeriosis yang biasa ditularkan melalui makanan (Hernández-González *et al*., 2021). Efek kerjanya dengan mengikat membran sitoplasma sel target dan membentuk tegangan pori-pori sehingga menyebabkan keluarnya metabolisme sel yang penting (Syaputri & Iwahashi, 2020). Pediosin termasuk di dalam anggota bakteriosin kelas IIa ini (Mora-Villalobos *et al*., 2020).

Bakteriosin kelas IIb merupakan bakteriosin yang terdiri dari dua peptida yang tidak termodifikasi. Kedua peptida tersebut ialah peptida komplementer yang berbeda satu sama lain. Kedua komponen peptida dalam jumlah sama bekerja secara sinergis untuk menghasilkan aktivitas antimikroba yang optimal (Hernández-González *et al*., 2021). Bakteriosin kelas IIb termasuk laktokoksin, laktasin, dan plantarisin (Kaur & Kaur, 2015). Keuntungan dari peptida komplementer bila digunakan bersama adalah aktivitasnya lebih aktif daripada digunakan secara individu dan mudah menerima perlakuan bioteknologi untuk meningkatkan aktivitas atau spesifisitasnya terhadap mikroorganisme target (Syaputri & Iwahashi, 2020).

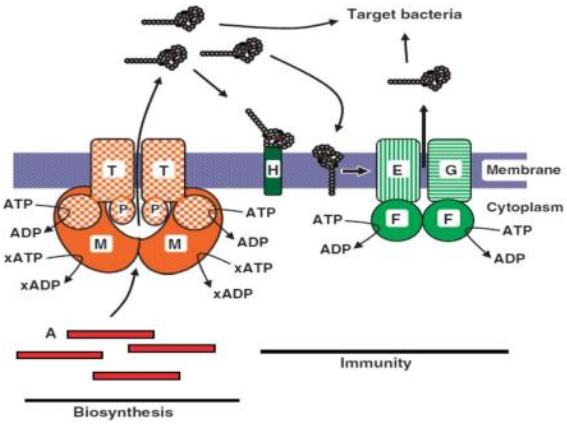
Bakteriosin kelas IIc merupakan bakteriosin sirkular, mengandung 35 sampai 70 asam amino, dan resisten terhadap banyak enzim proteolitik (Hernández-González *et al*., 2021). Bakteriosin ini disekresikan dengan urutan sinyal ujung-N tipe *sec* melalui jalur *sec-dependent* (ekspor protein melintasi membran sitoplasma ke periplasma bakteri dan membran luar) (Mokoena, 2017). Sedangkan bakteriosin kelas IId merupakan bakteriosin peptida tunggal berbentuk linier dan tidak memiliki urutan asam amino yang serupa dengan pediosin (kelas IIa) (Hernández-González *et al*., 2021).

2.3.3 Bakteriosin kelas III

Bakteriosin kelas III dikenal sebagai bakteriosin yang memiliki berat molekul besar (>30 kDa), labil terhadap panas, dan tidak termodifikasi. Bakteriosin kelas III biasanya akan inaktif dalam waktu 30 menit setelah terpapar suhu tinggi sampai 100°C (Hassan *et al*., 2020). Mekanisme kerja bakteriosin kelas III adalah bakteriolitik atau non-litik artinya mode bakterisidanya tidak menyebabkan lisis sel (Alvarez-Sieiro *et al*., 2016). Contoh beberapa bakteriosin dalam kelas ini adalah kolisins, megasins (*Bacillus megaterium*), klebisin (*Klebsiella pneumonia*), helvetisin I (*Lactobacillus helveticus*), dan enterolisin (*Enterococcus faecalis*) (Kaur & Kaur, 2015).

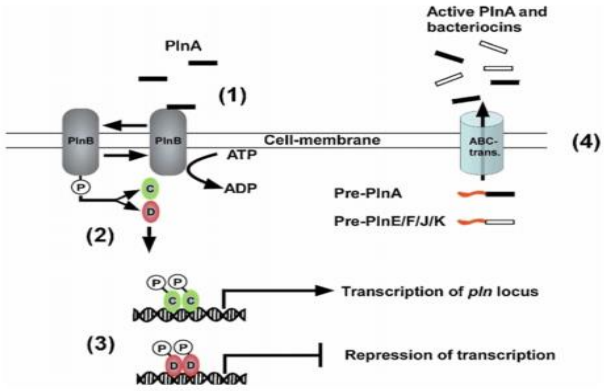
2.4 Biosintesis Bakteriosin

Bakteriosin disintesis oleh BAL mengikuti pola sintesis protein yaitu melalui jalur ribosomal mengikuti pola transkripsi dan translasi. Sintesis bakteriosin terjadi selama fase eksponensial pertumbuhan sel. Umumnya bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal, sedangkan kelompok lantibiotik disintesis secara ribosomal sebagai prepeptida kemudian mengalami modifikasi. Prinsip regulasi sintesis bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas serta dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan (Gambar 2.1) (Hasfan, 2014). Gen yang mengkodekan bakteriosin dan imunitas terorganisir oleh sekelompok operon yang dapat terletak pada kromosom, transposon atau plasmid (Juturu & Wu, 2018).



Gambar 2.1 Mekanisme sisntesis bakteriosin (Kareb & Aïder, 2020)

Produksi bakteriosin dari beberapa BAL juga diatur oleh mekanisme *quorum sensing*, yaitu mekanisme sintesis bakteriosin yang melibatkan peptida feromon. Sistem pengindraan quorum (*quorum sensing*) merupakan sistem sinyal untuk meningkatkan produksi bakteriosin terhadap respons adanya bakteri kompetitor. Sistem sinyal *quorum sensing* terjadi ketika sel berada pada kondisi kepadatan yang lebih tinggi dengan adanya sel kompetitor (Maldonado- Barragán & West, 2020). Mekanismenya mengacu pada sinkronisasi ekspresi gen, yaitu bakteri mensintesis, mengeksresi, dan mengakumulasi molekul sinyal kecil yang dikenal sebagai feromon (Kareb & Aïder, 2020). Misalnya, beberapa bakteriosin kelas II diatur oleh sistem regulasi tiga komponen. Mekanisme regulasi dan biosintesis bakteriosin diatur oleh tiga gen yang disebut komponen sistem regulator. Komponen sistem regulator tersebut adalah peptida penginduksi (peptida feromon), histidin protein kinase (reseptor feromon), dan respon regulator sitoplasmik (Gambar 2.2) (Cui *et al*., 2012).

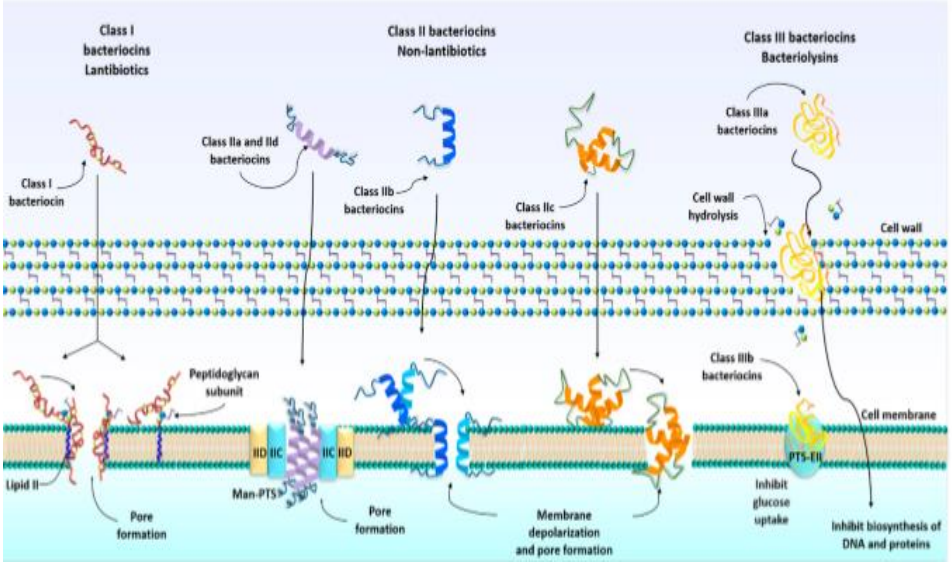


Gambar 2.2 Mekanisme sintesis bakteriosin melalui *quorum sensing* (Kareb & Aïder, 2020)

Peptida penginduksi di sintesis secara ribosomal sebagai prekursor dan berikatan khusus dengan histidin protein kinase. Histidin protein kinase aktif untuk memfosforilasi respon regulator, kemudian merangsang transkripsi gen target bakteriosin. Ketika bakteriosin telah mencapai ambang batas konsentrasi transkripsi dihentikan. Bakteriosin kemudian disekresi ke media ekstraseluler melalui sistem transport ABC (Kareb & Aïder, 2020).

2.5 Mekanisme Kerja Bakteriosin

Bakteriosin dapat bekerja melalui mekanisme yang berbeda untuk memberikan efek antimikroba, tetapi target kerja bakteriosin umumnya adalah membran sitoplasma sebagai reaksi awal bakteriosin dengan mengakibatkan rusaknya membran, memasuki sitoplasma kemudian mempengaruhi ekspresi gen dan sintesis protein (Gambar 2.3) (Abdulkarim *et al*., 2020; Heeney *et al*., 2019). Efeknya setelah terjadi kontak langsung pada permukaan mikroorganisme dan penggabungan ke dalam membran sitoplasma bakteri, terjadi pembentukan pori yang menyebabkan hilangnya ion intraseluler, gangguan gradien pH, dan gaya motif proton (Tumbarski *et al*., 2018).



Gambar 2.3 Mekanisme kerja bakteriosin (Hernández-González et al., 2021)

Mekanisme aktivitas bakteriosin adalah sebagai berikut: (1) molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel, (2) kontak langsung dengan membran mampu mengganggu potensial membran berupa ketidakstabilan membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat, dan (3) akibat ketidakstabilan membran menyebabkan terbentuknya lubang atau pori pada membran sel karena hilangnya PMF (Proton Motive Force). Lubang atau pori yang terbentuk mengakibatkan kebocoran pada membran sitoplasma ditunjukkan oleh adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler. Pengaruh pembentukan lubang sitoplasma merupakan dampak adanya bakteriosin yang menyebabkan terjadinya perubahan gradient potensial membran dan pelepasan molekul intraseluler maupun masuknya substansi ekstraseluler (lingkungan). Efeknya menyebabkan pertumbuhan sel terhambat dan menghasilkan proses kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin (Hafsan, 2014).

Bakteriosin yang khususnya menghambat bakteri Gram positif bekerja dengan cara menyerang dinding sel. Sedangkan banyak bakteriosin yang menghambat bakteri Gram negatif dengan menggaggu RNA polimerase, DNA girase, dan metabolisme protein sehingga menyebabkan kematian bakteri target (Negash & Tsehai, 2020). Bakteriosin tertentu seperti lantibiotik (kelas I) memiliki mekanisme kerja ganda. Mekanisme kerjanya dengan menghambat biosintesis dinding sel bakteri melalui pengikatan lipid II, bagian hidrofobik pembawa monomer peptidoglikan dari sitoplasma ke dinding sel, dan mengganggu viabilitas membran. Selain itu, lantibiotik juga menggunakan lipid II sebagai molekul docking untuk memulai proses penyisipan pada membran dan membetuk pori pada membran bakteri (Hernández-González *et al*., 2021).

2.6 Aplikasi Bakteriosin

Bakteriosin dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme termasuk BAL. Kemampuan bakteriosin dapat berperan sebagai senyawa antimikroba untuk menekan perkembangan mikroba pembusuk makanan dan patogen. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa suatu mikroorganisme diciptakan tidak hanya dapat merugikan, akan tetapi ada beberapa mikroorganisme yang dapat memberikan manfaat.

Allah SWT berfirman di dalam Q.S Ali 'Imran ayat 191 sebagai berikut:

الَّذِيْنَ يَذْكُرُوْنَ اللّٰهَ قِيَامًا وَّقُعُوْدًا وَّعَلٰى جُنُوْبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُوْنَ فِيْ خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِۚ
رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَاطِلًاۚ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ١٩١

Terjemah Kemenag (2019) : "(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), "Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia. Mahasuci Engkau. Lindungilah kami dari azab neraka".

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah, ayat di atas menjelaskan bahwa orang-orang berakal yaitu orang-orang yang senantiasa memikirkan ciptaan Allah dan merenungkan keindahan ciptaan-Nya. Allah juga tidak menciptakan semua ini sia-sia melainkan mempunyai hikmah dan tujuan di balik ciptaan itu semua. Contoh dari memikirkan ciptaan Allah yaitu adanya mikroorganisme termasuk kelompok *L. casei* yang dapat menghasilkan senyawa antimikroba dapat dimanfaatkan di berbagai bidang, seperti industri makanan, kesehatan dan kedokteran hewan. Menurut (Fatwa MUI No. 1 Tahun 2010) bahwa produk mikrobial diperoleh dengan bantuan mikroba yang dapat berupa sel mikroba itu sendiri maupun berupa hasil metabolisme berupa asam organik, asam amino termasuk senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh kelompok *L. casei.* Pemanfaatan mikroba dan produk mikrobial tersebut halal selama tidak membahayakan dan tidak terkena najis. Sedangkan mikroba dan produk mikrobial yang tumbuh pada media pertumbuhan yang terkena najis apabila dapat dipisahkan hukumnya halal setelah disucikan secara syar'i. Kecuali mikroba dan produk mikrobial yang memanfaatkan unsur babi dalam pertumbuhannya hukumnya haram.

2.6.1 Industri makanan

Bakteriosin sebagai agen antimikroba alami sangat menarik sebagai alternatif pengganti pengawet kimia untuk memenuhi permintaan konsumen yang semakin meningkat akan makanan yang aman dan makanan siap saji dengan pemrosesan minimal. Karakteristik bakteriosin tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa sehingga dapat dimasukkan dalam produk makanan tanpa mengubah sifat organoleptiknya. Selain itu, beberapa bakteriosin stabil pada pH, suhu tinggi dan di berbagai konsentrasi garam. Bakteriosin sebagai pengawet makanan menawarkan beberapa keuntungan, seperti memperpanjang umur simpan makanan, mengurangi resiko penularan patogen melalui makanan, mengurangi kerugian ekonomi akibat pembusukan, penerapan perawatan yang tidak terlalu berat selama pemrosesan tanpa mengorbankan keamanan makanan, nutrisi, dan organoleptiknya. Pada saat ini nisin adalah satu-satunya bakteriosin yang telah dilisensikan sebagai biopreservatif dan diproduksi dalam sediaan komersial. Nisin banyak digunakan dalam industri produk susu untuk mengendalikan clostridia dan kontaminasi dari listeria setelah pemrosesan. Nisin telah terbukti menghambat beberapa bakteri patogen pembusuk dalam berbagai matriks makanan, termasuk produk susu, daging dan produk daging, produk ikan dan makanan laut, jus dan minuman, buah-buahan, sayuran dan sereal (Soltani *et al*., 2021).

2.6.2 Antikanker

Beberapa bakteriosin telah menunjukkan aktivitas antikanker dengan bertindak selektif melawan sel kanker. Bakteriosin diproduksi oleh bakteri Gram negatif, seperti sebagai mikrosin E492 dan kolkisin (A, D, E1, E2, E3), atau oleh bakteri Gram positif, termasuk nisin telah menunjukkan efek sitotoksik melawan

sel manusia yang ganas. Sitotoksisitas bakteriosin terhadap sel kanker disebabkan oleh induksi apoptosis atau depolarisasi membran sel yang menyebabkan perubahan permeabilitas (Kaur & Kaur, 2015). Misalnya yang ditunjukkan dalam kepala dan leher sel karsinoma sel skuamosa, nisin menginduksi peningkatan fragmentasi DNA atau apoptosis dan mengurangi proliferasi sel melalui induksi penangkapan siklus sel dalam sel kanker. Contoh lainnya adalah azurin, bakteriosin yang diproduksi oleh strain *Pseudomonas aeruginosa*, dipelajari sebagai obat antikanker potensial karena pengikatan selektifnya pada sel kanker manusia, efek sitotoksik dan apoptosis yang dihasilkan, tanpa mempengaruhi sel normal (Soltani *et al*., 2021). Plantarisin P1053 menunjukkan efek normal dan bersifat kankerogenik garis sel epitel usus melalui peningkatan viabilitas sel sehat dan pengurangan proliferasi sel kanker (Syaputri & Iwahashi, 2020). Penting untuk diperhatikan bahwa mayoritas penelitian yang berkaitan dengan sifat antikanker dari bakteriosin masih bersifat *in vitro*. Oleh karena itu, diperlukan untuk validasi secara *in vivo*.

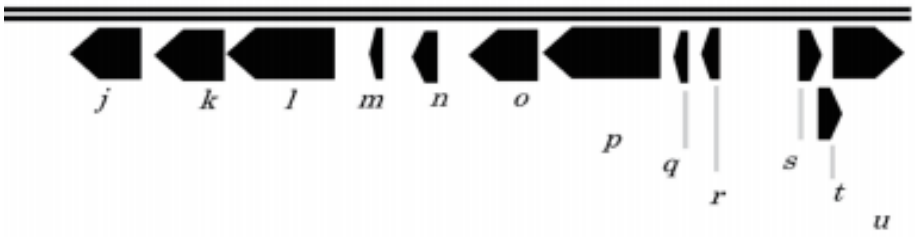
2.6.3 Kedokteran hewan

Bakteriosin dapat digunakan untuk mendorong pertumbuhan hewan ternak dengan mengendalikan atau menghambat patogen. Hal tersebut akan berdampak positif pada kesehatan hewan. Misalnya, fraksi pediosin PA1 yang dimurnikan sebagian telah terbukti secara signifikan meningkatkan kinerja ayam broiler yang terinfeksi *Clostridium perfringens* (Soltani *et al.*, 2021). Penggunaan nisin di industri kedokteran hewan sebagai obat pencegah dan sebagai obat untuk sapi mastitis juga telah dieksplorasi. Mastitis sapi merupakan penyakit yang memiliki

dampak ekonomi yang besar di industri susu dunia, dan menjadi sumber utama kerugian ekonomi di kalangan peternak sapi. Namun, ada kekhawatiran yang meningkat terkait penggunaan antibiotik untuk mengendalikan mastitis sapi, yang mengakibatkan kontaminasi antibiotik dalam susu. Injeksi berbasis nisin menunjukkan obat yang dapat mengendalikan hampir 99,9% bakteri penyebab mastitis seperti *S. aureus* dan *Streptococcus agalactiae* setelah pemberian obat (Perez *et al*., 2014).

2.7 Gen *Plantarisin A*

Produksi bakteriosin pada prinsipnya diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas yang terorganisir oleh sekelompok operon. Plantarisin yang terkenal sebagai bakteriosin yang diproduksi oleh *L. plantarum* diatur oleh operon yang tersusun dari beberapa gen seperti gen *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnI*, *plnF*, *plnE* dan *plnG* (Gambar 2.4). Operon yang terorganisir secara genetik, mengkode gen struktural (produksi bakteriosin), gen imunitas, dan gen sekresi. Gen *plnA* sendiri merupakan gen yang bertanggung jawab untuk induksi transkripsi gen yang ada dalam operon (Jabbar *et al*., 2020).



Gambar 2.4 Kelompok gen pengkode biosintesis plantarisin; j. *plnD*, respon regulator, represor; k. *plnC,* respon regulator, aktivator; l. *plnB*, histidine protein kinase, sensor protein; m. *plnA*, peptida prekursor, faktor induksi; n. *plnQ*, protein biosintesis plantarisin; o. *plnP*, protein imunitas bakteriosin; p. *plnO*, protein biosintesis plantarisin; q. *plnN*,

peptida prekursor bakteriosin; r. *plnM*, protein imunitas bakteriosin; s - t. *plnJ* dan *plnK*, plantarisin JK bakterioisn dua peptida; u. *plnL*, protein imunitas bakteriosin (Syaputri & Iwahashi, 2020)

Gen *plnA* pada dasarnya adalah gen pengkode peptida feromon. Pada beberapa BAL yang produksinya diatur oleh mekanisme *quorum sensing*, gen tersebut juga hadir dalam operon. Selain itu pada beberapa kasus *plnA* bertindak sebagai feromon kationik yang juga memiliki aktivitas antimikroba dalam merusak membran (Abdulhussain Kareem & Razavi, 2020). *PlnA* diduga berfungsi sebagai feromon yang mengaktifkan jalur *quorum sensing* tiga komponen yang terdiri dari protein kinase histidin terkait membran dan dua respons regulator. Peptida feromon yang telah disintesis kemudian diekspor dari sel berinteraksi dengan membran protein kinase histidin dari pengaturan sistem tiga komponen, kemudian memicu autofosforilasi sehingga kinase menjadi fosforilat, terjadi transfer fosfat ke dua respon regulator, kemudian pada gilirannya mengaktifkan ekspresi gen yang mengkode produksi bakteriosin (Paramithiotis *et al*., 2019). Kehadiran peptida feromon seperti yang di kodekan oleh gen *plnA* dimiliki sebagai fitur umum dalam regulasi sistem tiga komponen. Peptida feromon yang secara fungsional mirip dengan *plnA* dapat terdeteksi pada bakteri asam laktat penghasil bakteriosin lainnya. Karena dipercaya bahwa peptida feromon yang berinteraksi dengan histidin kinase hingga terjadi ekspresi gen pengkode bakteriosin (Hauge *et al*., 1998).

2.8 Gen Pengkode Bakteriosin

2.8.1 Pediosin

Pediosin yang terkenal sebagai bakteriosin yang diproduksi oleh *Pediococcus acidilactici*. Gen Pediocin AcH terletak di plasmid dan mereka diatur dalam kluster gen 3500 bp yang berbagi promotor dan terminator. Empat gen, masing-masing dengan situs pengikatan ribosom independen (rbs), kodon inisiasi dan terminasi dan urutan ditetapkan sebagai *papA*, *papB*, *papC* dan *papD* . *PapA* adalah gen struktural untuk pra-pediosin, sedangkan *papB* mengkode protein kekebalan. *PapC* dan *papD* membentuk mesin ekspor, dan diperlukan untuk translokasi membran dan penghilangan peptida terminal. *PapD* berbagi domain protease glisin ganda dengan protein ekspor ABC lainnya yang aktif dalam pengangkutan bakteriosin (Dimov *et al*., 2005).

2.8.2 Sakasin

Sakicin A adalah bakteriosin mirip pediocin lainnya yang diproduksi *Lactobacillus sakei*. Gen sakicin A diatur dalam dua operon. Ada enam gen yang berpartisipasi dalam sintesis sakicin A: *sapA* –gen untuk pra-sakicin A, *saiA* – gen yang mengkode protein imunitas sakicin A, *sapK* – protein histidin kinase, *sapR* – regulator respons, *sapT* – Pengekspor, pengikat ATP, dan *sapE* – protein transpor. *SapT* dan *sapE* didedikasikan untuk ekspor bakteriosin sementara sapK dan sapR berperan dalam regulasi ekspresi melalui mekanisme transduksi sinyal (Dimov *et al*., 2005).

2.8.3 Nisin

Salah satu operon bakteriosin yang berkarakteristik terbaik adalah yang mengkode biosintesis nisin oleh *Lactococcus lactis*. Gugus gen nisin berisi sebelas gen dan biasanya digambarkan sebagai nisABTCIPRKFEG. Dari gen-gen ini, *nisA* mengkodekan peptida prekursor; *nisB* dan *nisC* mengkodekan enzim yang diduga terlibat dalam reaksi modifikasi pascatranslasi; *nisT* mengkodekan protein transpor diduga dari keluarga translokator ABC yang mungkin terlibat dalam prekursor nisin yang dimodifikasi; *nisP* mengkodekan protease ekstraseluler yang terlibat dalam pemrosesan prekursor; *nisI* mengkodekan lipoprotein yang terlibat dalam perlindungan diri produsen terhadap nisin; dan *nisFEG* mengkode protein transporter diduga yang juga telah tersirat dalam kekebalan. Protein yang dikodekan oleh *nisR* dan *nisK* telah terbukti terlibat dalam regulasi biosintesis nisin. *NisR*, regulator respons, dan *nisK*, adalah protein histidin kinase sensor yang termasuk dalam kelas protein sistem regulasi transduksi sinyal (Dimov *et al*., 2005).

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif kualitatif. Kelompok *L. casei* telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba (Nisa', 2020), selanjutnya dilakukan deteksi keberadaan gen plantarisin A (*plnA*) pengkode bakteriosin melalui amplifikasi PCR dengan primer spesifik *plnA*. Data yang diperoleh berupa pita DNA hasil amplifikasi PCR gen *plnA*. Hasil positif dari amplifikasi PCR dilakukan sekuensing untuk mendapatkan urutan fragmen DNA gen *plnA*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September - Oktober 2021. Penelitian bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum ose, spatula, bunsen, *magnetic stirrer*, cawan petri (PYREX), tabung reaksi (PYREX), gelas ukur (PYREX), *hot plate* (Cimarex), erlenmeyer (PYREX), neraca analitik (Sartorius), autoklaf (ALP), *Laminar Air Flow* (Esco), inkubator (Heraeus), *water bath* (Memmert), *tube eppendorf* (mikrotube), *blue* tip, *yellow* tip, *white* tip, vortex (Thermolyne), *sentrifuge* (DLAB D2012 plus), mikrowave oven, mikropipet (BIO-

RAD), PCR Thermal Cycler (Select Bioproducts), perangkat elekroforesis (BIO-RAD), gel-doc UV transilluminator XR plus (BIO-RAD).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*), media MRS agar (*de Man, Rogosa, Sharpe*) (Merck), media MRS *broth* (Himedia), alkohol 70% (OneMed), akuades, PCR Master Mix (Promega GoTaq^{TM} Hot Start Master Mix (2X)), *Nuclease-free water* (Promega), 1 kb DNA ladder marker (Jena Bioscience), bubuk agarose (SciencePreneur), TE (Tris-EDTA) buffer pH 8, TBE buffer (Himedia), Ethidium Bromide (EtBr) (Sigma-Aldrich), *loading dye* (6X) (Promega), primer spesifik *plnA*-F dan *plnA*-R (Intregated DNA Technologies).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat dan bahan

Proses sterilisasi dilakukan pada beberapa alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian. Alat gelas yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Alat gelas seperti tabung reaksi, bagian mulut tabung ditutup dengan kapas dan kassa. Semua alat gelas dibungkus ke dalam plastik tebal yang tahan suhu tinggi. Media MRS agar dan MRS *broth* dimasukkan dalam gelas erlenmeyer, mulut tabung ditutup dengan kapas dan kassa. Sterilisasi alat dan media dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2 Pembuatan media MRSA (*de Man, Rogosa, Sharpe Agar*)

Media MRS agar digunakan untuk meremajakan kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*). Pembuatan media MRS agar diawali dengan

menimbang bubuk MRS agar sebanyak 17,05 gram. Bubuk MRS agar dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades sebanyak 250 ml. Media dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.3 Pembuatan media MRSB (*de Man, Rogosa, Sharpe Broth*)

Media MRS *broth* digunakan untuk menumbuhkan kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) sebelum dilakukan amplifikasi PCR. Pembuatan media MRS *broth* diawali dengan menimbang bubuk MRS *broth* sebanyak 13,78 gram. Bubuk MRS agar dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades sebanyak 250 ml. Media dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit (Soegandi *et al*., 2019).

3.4.4 Peremajaan kelompok *Lactobacillus casei*

Peremajaan kelompok *L. casei* dilakukan dalam media MRS agar. Media MRS agar yang selesai disterilisasi dituangkan ke cawan petri dan didiamkan hingga mengeras. Masing-masing spesies kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) diambil sebanyak 1 ose dari kultur stok. Kelompok *L. casei* ditumbuhkan pada media MRS agar dengan metode cawan gores. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (H.W. Deshpande & Bhate, 2017).

3.4.5 Pembuatan kultur kelompok *Lactobacillus casei*

Kelompok *L. casei* dikulturkan pada media MRSB sebelum dilakukan amplifikasi PCR. Media MRSB yang telah dibuat dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 15 ml. Masing-masing spesies kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) diinokulasikan sebanyak 1 ose dalam masing-masing 15 ml media MRSB. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.6 Amplifikasi dengan *direct PCR*

Proses amplifikasi gen plantarisin A (*plnA*) pada kelompok *L. casei* dilakukan dengan metode *Direct PCR Amplification*, yaitu menambahkan koloni tunggal bakteri secara langsung ke dalam reaksi PCR tanpa melakukan ekstraksi DNA (Ben-Amar *et al*., 2017). Masing-masing spesies kelompok *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) yang telah ditumbuhkan pada MRSB selama 24 jam diambil sebanyak 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam mikrotube. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit untuk medapatkan sel bakteri. Supernatan dibuang dan pelet akan digunakan untuk direct PCR. Reaksi PCR disiapkan di dalam PCR tube yang terdiri dari (2×) PCR Master mix 10 µL, (10 µM) primer *forward* 1 µL, (10 µM) primer *reverse* 1 µL, dan *nuclease-free water* hingga volume akhir 20 µL. Primer spesifik yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer (*plnA*) F (5'-GTACAGTACTAATGGGAG-3') dan R (5'-CTTACGCCAATCTATACG-3'). Selanjutkan Pelet sel bakteri diambil dengan ujung tip dan dimasukkan ke reaksi PCR. Pelet sel bakteri dan reaksi PCR dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet.

Kontrol negatif ditambahkan dalam proses amplifikasi PCR sebagai pembanding terhadap hasil positif dan untuk mendeteksi kemungkinan adanya kontaminasi pada PCR Master Mix. Kontrol negatif ialah reaksi PCR tanpa sampel DNA yang terdiri dari (2×) PCR Master Mix 10 µL, (10 µM) primer reverse 1 µL, (10 µM) primer reverse 1 µL, dan *nuclease-free water* hingga volume akhir 20 µL.

Proses amplifikasi dijalankan dengan tahap inisiasi 98°C selama 5 menit 1 siklus, denaturasi 94°C selama 1 menit, annealing 53°C selama 1 menit, extention 72°C selama 1 menit, final extention 72°C selama 1 menit. Tahap denaturasi, annealing, extention, dan final extention dilakukan 35 siklus (El Issaoui *et al*., 2021; Refay *et al*., 2020).

3.4.7 Elektroforesis produk PCR

Elektroforesis produk amplifikasi PCR gen *plnA* dilakukan dengan menggunakan 0,8% gel agarose. Pembuatan gel agarose 0,8% dilakukan dengan melarutkan bubuk agarose 0,32 g dan 40 ml buffer TBE 1X. Bubuk agarose dididihkan dengan microwave hingga larut dan bening. Larutan gel agarose ditunggu sedikit dingin dan ditambahkan 5 µL EtBr. Selanjutnya Larutan gel agarose dituangkan ke cetakan gel yang telah dipasang sisir pembuat sumuran dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel agarose selanjutnya dipindahkan ke dalam chamber elektroforesis dan dituangkan buffer TBE 1X sampai gel agarose terendam. Masing-masing sumuran gel agarose diisi sampel yang terdiri dari campuran (6X) *loading dye* 1,5 µL, *Nuclease-free water* 4 µL, dan produk PCR 3 µL. DNA ladder marker ditambahkan pada sumuran gel untuk menentukan ukuran molekul DNA. Sumuran gel agarose diisi secara berurutan, yaitu 1 kb DNA ladder

marker 5 µL, kontrol negatif, dan masing-masing sampel. DNA ladder marker digunakan untuk memperkirakan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan. Elektroforesis dijalankan selama 40 menit dengan tegangan 85 volt. Hasil elektroforesis kemudian diamati dibawah gel doc UV transiluminator (El Issaoui *et al*., 2021; Refay *et al*., 2020).

3.4.8 Sekuensing gen *plantarisin A*

Produk PCR yang menunjukkan hasil positif pada elektroforesis dilakukan sekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida gen *plantarisin A* (*plnA*). Proses sekuensing dilakukan dengan mengirimkan sampel ke 1st BASE, Singapura. Total volume sekuensing yang dikirimkan yaitu 30 µL produk PCR yang menunjukkan hasil positif dan 10 µL primer *forward* dan *reverse* untuk analisis masing-masing produk PCR. Data hasil sekuensing selanjutnya akan digunakan untuk dianalisis tingkat kesamaannya dengan urutan gen yang sudah tersedia di database GenBank NCBI.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan kualitatif berdasarkan adanya pita DNA gen plantarisin A kelompok *L. casei* dengan ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi PCR ±450 bp. Data hasil sekuensing dianalisis tingkat kesamaannya menggunakan web server NCBI dengan program BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

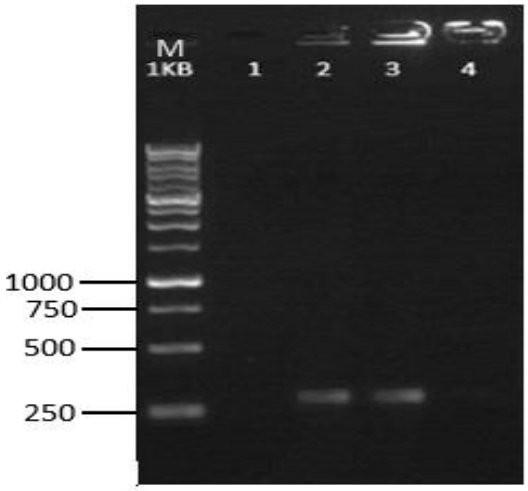
BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Amplifikasi PCR Gen *Plantarisin A*

Kelompok *L. casei* dilakukan deteksi gen plantarisin A (*plnA*) pengkode bakteriosin dengan amplifikasi *direct colony* PCR. Faktor yang perlu diperhatikan dalam *direct colony* PCR yaitu jumlah sel bakteri yang ditambahkan secara langsung ke reaksi PCR. Sel bakteri perlu ditambahkan dalam jumlah sedikit mungkin untuk meminimalkan inhibitor yang dapat mengakibatkan proses amplifikasi PCR gagal. Sehingga untuk mendapatkan jumlah sel yang seminimal mungkin digunakan ujung tip mikropipet untuk mengambil sel bakteri dari koloni tunggal. Menurut Ben-Amar *et al*. (2017) teknik *direct colony* PCR salah satu teknik molekuler yang paling berguna diterapkan di banyak bidang penelitian biologi dan diagnostik. Teknik ini memberikan keuntungan yang cukup besar dalam hal kecepatan dan efisiensi dibandingkan dengan PCR konvensional. Sebagian besar protokol PCR konvensional sering membutuhkan lisis basa menggunakan pelarut organik beracun dan memakan waktu yang lama untuk ekstraksi DNA. Teknik *direct colony* PCR telah diterapkan pada beberapa bidang penyelidikan termasuk pengendalian makanan dan mikrobiologi lingkungan, kesehatan manusia dan diagnosis penyakit genetik, pertanian dan bioteknologi tanaman. Karlsson & Semberg (2011) juga menggunakan teknik ini untuk mendeteksi bakteri probiotik termasuk *L. casei* dan *L. paracasei* pada makanan fermentasi.

Proses amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik *plnA* F dan R untuk mengamplifikasi fragmen gen yang ditargetkan. Hasil

amplifikasi PCR selanjutnya divisualisasikan pada gel agarosa dengan elektroforesis. Amplifikasi PCR gen *plnA* dari kelompok *L. casei* yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya pita yang terlihat pada visualisasi gel agarose (Gambar 4.1). Pada penelitian ini terdapat dua spesies dari kelompok *L. casei* yang menunjukkan hasil positif amplifikasi PCR gen *plnA*.



Gambar 4.1 Visualisasi hasil amplifikasi PCR gen *plnA* pada gel agarose. M: DNA Marker; 1: Kontrol negatif; 2: *L. casei*; 3: *L. paracasei*; 4: *L. rhamnosus*

Berdasarkan gambar 4.1 pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa gen *plnA* berhasil ditemukan pada *L. casei* dan *L. paracasei*. Amplifikasi PCR dengan primer spesifik *plnA* F dan R pada *L. casei* dan *L. paracasei* menghasilkan fragmen DNA dari gen *plnA* yang berukuran sekitar 300 bp dengan mensejajarkan marker. Hasil amplifikasi ini memiliki ukuran fragmen DNA berbeda dari ukuran target primer spesifik *plnA* F dan R yang digunakan. Posisi penempelan primer *plnA* F dan R yang berbeda terjadi karena amplifikasi fragmen DNA 450 bp pada *L. plantarum* menyimpan struktur lengkap gen *plnA* dan hanya 300 bp yang dihasilkan dengan menggunakan DNA dari *L. casei* dan *L. paracasei*. Perberbedaan tersebut

juga telihat pada hasil penelitian El Issaoui *et al.* (2021), amplifikasi PCR gen *plnA* menghasilkan ukuran fragmen DNA ±450 bp pada *L. plantarum* 11. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian Mustopa *et al*. (2016), amplifikasi PCR gen *plnA* yang tebentuk pada *L. plantarum* S34 berukuran ±300 bp.

Allah telah mengatur semua kejadian pada seluruh makhluk sesuai dengan sistemnya secara teliti dan sempurna seperti penciptaan gen. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Al-Furqon ayat 2 sebagai berikut:

ۨالَّذِيْ لَهٗ مُلْكُ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَّلَمْ يَكُنْ لَّهٗ شَرِيْكٌ فِى الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَّرَهٗ تَقْدِيْرًا ٢

Terjemah Kemenag (2019): "(Yaitu Zat) yang milik-Nyalah kerajaan langit dan bumi, (Dia) tidak mempunyai anak, dan tidak ada satu sekutu pun dalam kekuasaan(-Nya). Dia telah menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat".

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah, ayat di atas menjelaskan bahwa Allah pemilik langit dan bumi dan yang berkuasa atas keduanya, mengutus dan mengurusnya menurut hikmah kebijaksanaan-Nya sesuai dengan kepentingan dan kemaslahatan masing-masing ciptaan-Nya itu. Allah menciptakan gen *plnA* pada bakteri memiliki kepentingan dan kemanfaatan. Gen *plnA* ini mengkode produksi bakteriosin pada kelompok *L. casei* yang berfungsi sebagai substansi antimikroba. Substansi antimikroba yang diproduksi tersebut dapat bermanfaat menghambat bakteri patogen. Pada ayat ini kata yang artinya ukuran/ketentuan/kadar juga menjelaskan bahwa segala sesuatu diciptakan dan ditetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat, teliti, dan penuh hikmah. Fragmen DNA gen *plnA* juga diciptakan sesuai ukurannya, sehingga gen *plnA* tersebut dapat mengkode produksi bakteriosin sebagai substansi antimikroba.

Hasil deteksi gen *plnA* dari kelompok *L. casei* menunjukkan bahwa *L. casei* dan *L. paracasei* memiliki gen pengkode bakteriosin. Kehadiran gen tersebut mengkonfirmasi bahwa adanya aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *L. casei* dan *L. paracasei* dikarenakan keduanya memproduksi substansi antimikroba berupa bakteriosin. Gen *plnA* yang digunakan untuk mendeteksi bakteriosin pada kelompok *L. casei* ini merupakan gen pengkode peptida feromon yang berperan sebagai faktor penginduksi pada sintesis bakteriosin. *PlnA* terkenal sebagai peptida feromon yang menginduksi produksi bakteriosin plantarisin pada *L. plantarum* (Čanak *et al*., 2018).

L. casei dan *L. plantarum* sebagai bakteri probiotik yang sering ditemukan pada lingkungan hidup yang sama. Keduanya sering ditemukan bersama sebagai anggota mikrobiota saluran pencernaan manusia. Di dalam salauran pencernaan, ada berbagai relung ekologi dan berbagai Lactobacillus termasuk *L. casei* dan *L. plantarum* telah diisolasi dari usus (Goldstein *et al*., 2015). Menurut Yu *et al*. (2015) spesies *L. casei* menunjukkan kemampuan beradaptasi di berbagai ekologi yang baik. Ada delapan gen yang secara bersama ditemukan pada genome *L. casei* dan mikrobiota usus lain termasuk *L. plantarum* yang terlibat pada adaptasinya di saluran pencernaan. Sehingga diperkirakan bahwa *L. casei* memiliki keragaman genetik yang luas. Persamaan dari gen *plnA* sebagai pengkode bakteriosin pada *L. plantarum* ditemukan juga pada *L. casei* dan *L. paracasei* di penelitian ini diduga karena ketiganya berbagi relung ekologi yang sama. Unsur-unsur genetik bakteriosin paling sering bersifat plasmid, tetapi juga dapat berupa kromosom. Ini

menjelaskan bahwa bakteriosin yang sama dapat diproduksi oleh spesies yang berbeda (Kareb & Aïder, 2020)

Bakteri *L. rhamnosus* pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, akan tetapi menunjukkan hasil negatif amplifikasi PCR gen *plnA* (Gambar 4.1). Hasil tersebut dapat terjadi karena *L. rhamnosus* mengandung gen bakteriosin lain yang tidak terdeteksi dengan gen *plnA* pada penelitian ini. Hasil yang serupa ditunjukkan pada penelitian Stoyancheva *et al*. (2014) bahwa 40% dari semua isolat Lactobacillus yang positif pada uji fenotipik, hanya 6% dari semua isolat yang memiliki gen pengkode bakteriosin. Perbedaan ini bisa terjadi karena banyak gen pengkode bakteriosin yang berbeda pada spesies-spesies Lactobacillus.

Adanya gen *plnA* pada kelompok *L. casei* ditemukan bahwa produksi bakteriosin tertentu tidak harus terkait dengan satu spesies saja. Gen *plnA* yang telah dijelaskan sebagai pengkode bakteriosin pada *L. plantarum* juga ditemukan pada *L. casei* dan *L. paracasei* di penelitian ini. Sehingga gen pengkode bakteriosin lain diperkirakan dapat ditemukan pada *L. rhamnosus*. Sejumlah bakteriosin lain yang telah ditemukan seperti kurvasin dari *L. curvatus*, asidosin dari *L. acidophilus*, brevicin dari *L. brevis*, sakasin dari *L. sakei* (Collins *et al*., 2017) dapat digunakan pada *L. rhamnosus*. Menurut Garcia-Gutierrez *et al*. (2020) produksi bakteriosin tertentu tidak harus terkait dengan satu spesies maupun terbatas pada organisme yang berbagi lingkungan tertentu. Hasil yang ditunjukkan dari gen kurvasin A sebagai pengkode bakteriosin yang ditemukan pada *L. curvatus* LTH1174 juga diproduksi oleh *L. sake* CTC494. Menurut Zhao *et al*. (2020) laktosin 160 yang

diisolasi dari *L. rhamnosus* zrx01 memiliki efek antibakteri pada *Micrococcus luteus* dan bakteri patogen lainnya.

Selain itu, aktivitas antibakteri dari *L. casei*, *L. paracasei*, dan *L. rhamnosus* dapat juga berasal dari produksi asam organik. Efek bakterisida dari suatu aktivitas antimikroba dapat berasal dari adanya produksi asam organik saja ataupun berasal dari kombinasi produksi asam organik dan bakteriosin. Berdasarkan hasil penelitian ini yang jelas menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri pada bakteri *L. casei* dan *L. paracasei* berasal dari adanya produksi bakteriosin dan produksi asam organik. Sesuai yang dijelaskan Agrioupoulou *et al*. (2020) bahwa BAL termasuk kelompok *L. casei* dapat memproduksi substansi antimikroba seperti asam organik (laktat, sitrat, asetat, fumerat, dan malat), hidrogen peroksida, diasetil, etanol, dan bakteriosin. Substansi antimikroba yang dihasilkan tersebut terbagi atas peptida yang disintesis secara ribosomal dan non ribosomal (Vasilchenko & Rogozhin, 2019). Bakteriosin termasuk peptida yang disintesis secara ribosomal dan dapat dikeluarkan ke lingkungan ekstraseluller. Namun, tidak semua spesies dari golongan BAL dapat menghasilkan bakteriosin sebagai substansi antibakteri (Chang *et al*., 2016). Sedangkan substansi antimikroba lain seperti asam-asam organik dihasilkan selama proses fermentasi dari BAL (Rakhmanova *et al*., 2018).

4.2 Hasil Sekuensing

Hasil amplifikasi PCR gen *plnA* yang menunjukkan hasil positif, yaitu *L. casei* dan *L. paracasei* selanjutnya dilakukan sekuensing. Berdasarkan hasil sekuensing didapatkan sekuens DNA gen *plnA* dari spesies *L. casei* dan *L. paracasei* (Gambar 4.2). Sekuens DNA tersebut kemudian dianalisis menggunakan

program *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST) melalui website NCBI. Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil sekuens yang diperoleh (sekuens *query*) dengan hasil sekuens DNA yang telah didepositkan pada database GenBank secara publik (Rau *et al*., 2018). Hasil dari analisis BLAST menunjukkan tingkat kesamaan urutan nukleotida gen *plnA* dari bakteri *L. casei* dan *L. paracasei* dengan yang ada dalam *database* GenBank.

> *L. casei*
TAAAATGTACGTTAATAGAAATAATTTCCTCCGTACTTCAAAAACACATTATCCTAAAAGCGA
GGTGATTATTATGAAAATTCAAATTAAAGGTATGAAGCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAA
AAATAGTAGGTGGAAAGAGTAGTGCGTATTCTTTGCAGATGGGGGCAACTGCAATTAAACA
GGTAAAGAAACTGTTTAAAAAATGGGGATGGTAATTGATTTA
> *L. paracasei*
ATTTCATGGTGATTCACGTTTAAATTTAAAAAATGTACGTTAATAGAAATAATTCCTCCGTACT
TCAAAAACACATTATCCTAAAAGCGAGGTGATTATTATGAAAATTCAAATTAAAGGTATGAA
GCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAAAAATAGTAGGTGGAAAGAGTAGTGCGTATTCTTTGC
AGATGGGGGCAACTGCAATTAAACAGGTAAAGAAACTGTTTAAAAAATGGGGATGGTAATT
GATTTA

Gambar 4.2 Hasil sekuensing gen *plnA* pada *L. casei* dan *L. paracasei*

Berdasarkan hasil analisis BLAST pada tabel 4.1 dapat diketahui bahwa sekuens DNA gen *plnA* pada *L. casei* dan *L. paracasei* homolog dengan sekuens DNA gen *plnA L. plantarum*. Sekuens DNA gen *plnA L. casei* memiliki kesamaan dengan sekuens DNA gen *plnA L. plantarum* strain EG.LP.18.7 sebesar 99.56%. Sedangkan sekuens DNA gen *plnA L. paracasei* memiliki kesamaan dengan sekuens DNA gen *plnA L. plantarum* strain EG.LP.18.7 sebesar 100%. Menurut Kasi *et al*. (2019) menyatakan bahwa identitas maksimal adalah nilai tertinggi dari presentase identitas atau kecocokan antara sekuens *query* dengan sekuens yang ada di database. Sekuens *query* dinyatakan cocok jika presentase kemiripannya tidak kurang dari 97%.

Tabel 4.1 Hasil BLAST sekuens DNA gen *plnA L. casei* dan *L. paracasei*

No	Spesies	Hasil BLAST		
		Spesies Homolog	Ident (%)	Seq Id
1	*L. casei*	*L. plantarum* strain EG.LP.18.7 plantaricin A (plnA) gene	99,56%	MN172266.1
2	*L. paracasei*	*L. plantarum* strain EG.LP.18.7 plantaricin A (plnA) gene	100%	MN172266.1

Penelitian ini menunjukkan adanya gen *plnA* pada *L. casei* dan *L. paracasei* memiliki kesamaan dengan gen *plnA* pada *L. plantarum*. Gen *plnA* adalah gen yang mengkode peptida feromon. Banyak dilaporkan bahwa aktivitas *plnA* terkenal sebagai peptida feromon yang bekerja dalam menginduksi produksi bakteriosin plantarisin pada *L. plantarum*. Stoyancheva *et al*. (2014) mengatakan bahwa ada peptida yang secara fungsional mirip seperti *plnA* terdeteksi pada bakteri asam laktat penghasil bakteriosin lainnya. Pada penelitian Rizzello *et al.* (2014) menyebutkan bahwa gen *plnA* menjadi target gen pengkode bakteriosin untuk deteksi pada BAL seperti *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactobacillus sakei*, dan *Lactobacillus viridescens*. Hasil yang ditunjukkan pada penelitian El Issaoui *et al.* (2021) gen *plnA* ditemukan pada *L. plantarum* 11 dan *Weissella paramesenteroides* 36.

Bakteriosin diproduksi karena adanya gen pengkode produksi bakteriosin yang terorganisir dalam operon. Operon tersebut secara genetik terdiri atas gen struktural (produksi bakteriosin), gen imunitas, dan gen sekresi. Menurut Maldonado- Barragán & West (2020) pada beberapa kasus produksi bakteriosin

dari beberapa BAL dalam mekanisme nya melibatkan peptida feromon seperti produksi plantarisin oleh *L. plantarum* dan gasserin oleh *L. gasseri*. Hal tersebut juga dijelaskan oleh Jabbar *et al*. (2020) bahwa kehadiran gen *plnA* merupakan fitur umum dari BAL yang melibatkan peptida feromon dalam produksi bakteriosinnya. Gen *plnA* mensintesis peptida feromon yang bertanggung jawab untuk induksi transkripsi gen yang tersusun dalam operon, berarti produksi bakteriosin yang mekanisme biosintesisnya mirip dapat dikaitkan dengan keberadaan gen pengkode peptida feromon dalam Lactobacillus. Peptida feromon tersebut hadir dalam mekanisme *quorum sensing*, yaitu sistem persinyalan yang menyebabkan produksi bakteriosin diaktifkan. Aktivitas peptida feromon *plnA* dalam produksi bakterisoin adalah terkait dengan histidin kinase. Peptida feromon akan berinteraksi dengan histidin kinase, sehingga memicu autofosforilasi dan selanjutnya terjadi transfer gugus fosfat ke respons regulator. Respons regulator akan mengikat elemen promotor tertentu, sehingga mengaktifkan ekspresi gen (Arief *et al*., 2015).

Banyak penelitian telah melakukan skrining karakterisasi parsial dari hasil purifikasi bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri *L. plantarum* termasuk dalam kategori bakteriosin kelas II (Jabbar *et al*., 2020). Bakteriosin kelas II dikenal sebagai bakteriosin yang memiliki berat molekul < 10 kDa, aktivitas penghambatan yang luas, stabil terhadap panas, dan stabil pada pH asam hingga basa (Syaputri & Iwahashi, 2020). Ditemukannya kesamaan gen *plnA* pengkode bakteriosin pada *L. casei* dan *L. paracasei* diperlukan karakterisasi mengenai bakteriosin yang diproduksi oleh keduanya. Karakterisitik tersebut untuk mengetahui apakah ada persamaan maupun perbedaan antara bakteriosin yang diproduksi *L. plantarun*

dengan *L. casei* dan *L. paracasei*. Sehingga dapat dikembangkan terkait potensi kegunaannya.

Penelitian bidang molekuer seperti deteksi gen *plnA* ini menjadi jalan untuk menjadi kajian pengembangan dalam ilmu pengetahuan. Sebagaimana firman Allah SWT pada Q.S At-Talaq ayat 12 sebagai berikut:

اَللّٰهُ الَّذِيْ خَلَقَ سَبْعَ سَمٰوٰتٍ وَّمِنَ الْاَرْضِ مِثْلَهُنَّۗ يَتَنَزَّلُ الْاَمْرُ بَيْنَهُنَّ لِتَعْلَمُوْٓا اَنَّ اللّٰهَ عَلٰى كُلِّ شَيْءٍ قَدِيْرٌ ۙ وَّاَنَّ اللّٰهَ قَدْ اَحَاطَ بِكُلِّ شَيْءٍ عِلْمًا ١٢

Terjemah Kemenag (2019): "Allahlah yang menciptakan tujuh langit dan (menciptakan pula) bumi seperti itu. Perintah-Nya berlaku padanya agar kamu mengetahui bahwa Allah Mahakuasa atas segala sesuatu dan ilmu Allah benar-benar meliputi segala sesuatu".

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah, ayat di atas menjelaskan bahwa kekuasaan Allah jelas nyata. Allah yang menciptakan tujuh lapis langit dan demikian juga penciptaan bumi. Allah telah mengatur semuanya sesuai dengan ilmu-Nya yang Mahaluas, meliputi segala sesuatunya di langit dan di bumi walau bagaimanapun kecilnya, baik yang kasat mata maupun yang tersembunyi, kecuali diketahui Allah. Tidak ada yang tersembunyi bagi-Nya. Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi telah merambah ke seluruh aspek bidang kehidupan manusia. Penemuan gen *plnA* sebagai pengkode bakteriosin dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi zat antimikroba dengan rekayasa genetika. Adanya gen pengkode bakteriosin ini dapat digunakan untuk produksi bakteriosin dengan ekspresi gen menggunakan genetika rekombinan. Dengan genetika rekombinan hasil produksi bakteriosin dapat meningkat, sehingga bisa di aplikasikan dalam skala industri seperti makanan, obat-obatan, dan kesehatan.

Menurut (Fatwa MUI No. 35 Tahun 2013), melakukan rekayasa genetika terhadap hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme diperbolehkan (mubah) asalkan terdapat aspek kebermanfaatan, tidak membahayakan terhadap manusia maupun lingkungan, serta tidak menggunakan gen atau bagian dari tubuh manusia. Sedangkan pada produk hasil rekayasa genetika, yang biasa disebut Genetically Modified Food (GMF), maka berstatus halal asalkan bermanfaat, tidak membahayakan, dan jika berasal dari hewan maka hewan tersebut harus dalam kategori ma'kul al-lahm (jenis hewan yang dagingnya halal dikonsumsi). Media pertumbuhan bakteri juga perlu diperhatikan kehalalannya, tidak tercampur oleh bahan yang haram. Begitu pula gen yang disisipkan harus berasal dari yang halal.

BAB V
PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen *plnA* pengkode bakteriosin dapat terdeteksi pada dua spesies dari kelompok *L. casei*, yaitu spesies *L. casei* dan *L. paracasei*. Hal ini menjelaskan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh *L. casei* dan *L. paracasei* tidak hanya berasal dari produksi asam organik (asam laktat) tetapi juga produksi bakteriosin. Berdasarkan hasil analisis BLAST sekuens gen *plnA* dari *L. casei* dan *L. paracasei* ada kemiripan dengan gen *plnA* dari *L. plantarum* strain EG.LP.18.7.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu

1. Deteksi dengan gen pengkode bakteriosin yang lain seperti sakasin, kurvasin, pediosin, atau nisin perlu dilakukan untuk mengetahui gen yang mengkode bakteriosin pada ketiga spesies kelompok *L. casei*.
2. Purifikasi bakteriosin yang dihasilkan masing-masing perlu dilakukan untuk mengetahui sifat/karakteristiknya.

DAFTAR PUSTAKA

Abdulhussain Kareem, R., & Razavi, S. H. (2020). Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *Journal of Food Safety*, *40*(1), 1–12. https://doi.org/10.1111/jfs.12735

Abdulkarim, I. H., Mohammed, S. S. D., & Orukotan, A. A. (2020). Gene Identification for Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Selected Fermented Foods. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 1-12. https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2020/v3i430090

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms*, *8*(6), 1–23. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952

Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *49*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016

Aktas B, De Wolfe TJ, Safdar N, Darien BJ, Steele JL (2016) The Impact of *Lactobacillus casei* on the Composition of the Cecal Microbiota and Innate Immune System Is Strain Specific. *PLoS ONE, 11*(5), e0156374. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156374

Al-zaiadi, R. E., Waaili, J. R. A. L., & Al-hadedy, L. T. (2019). Moleculer Detection of Gene Encoding for Bacteriocin in Vaginal Lactobacillus spp. Isolated from Healthy Women. *Biochemical and Cellular Archives*, *8*(2), 1727–1730.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 2939–2951. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9

Arief, I. I., Budiman, C., Jenie, B., Andreas, E., & Yuneni, A. (2015). Plantaricin IIA-1A5 from Lactobacillus plantarum IIA-1A5 displays bactericidal activity against Staphylococcus aureus. *Beneficial Microbes*, *6*(4), 603-613. https://doi.org/10.3920/BM2014.0064

Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/584183

Azizah, N., Suradi, K., & Gumilar, J. (2018). Pengaruh Konsentrasi Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus casei* Terhadap Mutu Mikrobiologi dan Kimia Mayonnaise Probiotik. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, *18*(2), 79-85.

Basa, E. L. U., Abinawanto, Sophian, A., Julendra, H., & Sofyan, A. (2020). The detection of plantaricin-encoding genes and their amino acid profiles in lactobacillus plantarum akk30 isolated from indonesian native chicken. *Biodiversitas*, *21*(12), 5792–5799. https://doi.org/10.13057/biodiv/d211241

Ben-Amar, A., Oueslati, S., & Mliki, A. (2017). Universal direct PCR amplification

system: a time- and cost-effective tool for high-throughput applications. *3 Biotech*, *7*(4), 1–7. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0890-7

Bibalan, M. H., Eshaghi, M., Rohani, M., Pourshafie, M. R., & Talebi, M. (2017). Determination of bacteriocin genes and antibacterial activity of lactobacillus strains isolated from fecal of healthy individuals. *International journal of molecular and cellular medicine*, *6*(1), 1–11.

Bondi, M., Lauková, A., De Niederhausern, S., Messi, P., & Papadopoulou, C. (2017). Natural preservatives to improve food quality and safety. *Journal of Food Quality*, *2017,* 1–3. https://doi.org/10.1155/2017/1090932

Bottari, B., Felis, G. E., Salvetti, E., Castioni, A., Campedelli, I., Torriani, S., Bernini, V., & Gatti, M. (2017). Effective identification of Lactobacillus casei group species: Genome-based selection of the gene mutL as the target of a novel multiplex PCR assay. *Microbiology (United Kingdom)*, *163*(7), 950–960. https://doi.org/10.1099/mic.0.000497

Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zadravec, M., ... & Frece, J. (2018). Isolation and characterisation of L. plantarum O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food technology and biotechnology*, *56*(4), 581-589. https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5707

Capurso, L. (2019). Thirty years of Lactobacillus rhamnosus GG: a review. *Journal of clinical gastroenterology*, *53*, S1-S41. https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000001170

Chang, M. H., Hong, S. F., Chen, J. H., Lin, M. F., Chen, C. S., & Wang, S. C. (2016). Antibacterial activity Lactobacillus plantarum isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricin genes. *African Journal of Microbiology Research*, *10*(22), 796-803. https://doi.org/10.5897/AJMR2016.7922

Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. T. (2018). Science Direct Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 23–28. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011

Collins, M. D., Phillips, B. A., & Zanoni, P. (1989). Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei sp. nov., subsp. paracasei and subsp. tolerans, and Lactobacillus rhamnosus sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *39*(2), 105-108. https://doi:10.1099/00207713-39-2-105

Collins, F. W., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Gómez-Sala, B., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete Lactobacillus Pan-genome. *Scientific reports*, *7*(1), 1-14.

Choi, J. H., Moon, C. M., Shin, T. S., Kim, E. K., McDowell, A., Jo, M. K., ... & Kim, Y. K. (2020). Lactobacillus paracasei-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Experimental & molecular medicine*, *52*(3), 423-437. https://doi.org/10.1038/s12276-019-0359-3

Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., & Cui, H. (2012). Class IIa bacteriocins: Diversity and new developments. *International Journal*

of Molecular Sciences, *13*(12), 16668–16707. https://doi.org/10.3390/ijms131216668

Cui, Y., Luo, L., Wang, X., Lu, Y., Yi, Y., Shan, Y., ... & Lü, X. (2021). Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(1), 863-899.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. de S. (2014). Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 527–536. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041

Deswindra, M. R., Oktarlina, R. Z., & Bustomi, E. C. (2018). Potensi Agen Probiotik Lactobacillus rhamnosus Sebagai Modalitas Terapi Asma. *Jurnal Majority*, *7*(3), 222-227.

Dimov, S., Ivanova, P., & Harizanova, N. (2005). Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *19*(sup2), 4-10.

Diza, Y. H., Asben, A., & Anggraini, T. (2020). Isolasi, identifikasi dan penyiapan sediaan kering Bakteri Asam Laktat yang berpotensi sebagai probiotik dari dadih asal Sijunjung Sumatera Barat. *Jurnal Litbang Industri*, *10*(2), 155-164.

Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., ... & de Vos, W. M. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 Lactobacillus rhamnosus strains and their comparison with strain GG. *PLoS genetics*, *9*(8). 1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003683

Ehsani, A., Hashemi, M., Afshari, A., & Aminzare, M. (2018). Probiotic white cheese production using coculture with Lactobacillus species isolated from traditional cheeses. *Veterinary world*, *11*(5), 726–730. https://dx.doi.org/10.14202%2Fvetworld.2018.726-730

El-Arabi, N. I., Salim, R. G., Abosereh, N. A., & Abdelhadi, A. A. (2018). Molecular characterization of some antilisterial bacteriocin genes from Enterococcus faecium and Pediococcus pentosaceus. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *46*(3), 288-299. https://doi.org/10.4014/mbl.1803.03001

El Issaoui, K., Khay, E. O., Abrini, J., Zinebi, S., Amajoud, N., Senhaji, N. S., & Abriouel, H. (2021). Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Archives of Microbiology*, *203*(2), 597–607. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02053-0

Field, D., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, *20*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.004

Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, *365*(20), 1–20. https://doi.org/10.1093/femsle/fny213

Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, *11*(4), 1–17.

https://doi.org/10.3390/ani11040979

Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Colquhoun, I. J., Vior, N. M., Rodríguez, J. M., Mayer, M. J., ... & Narbad, A. (2020). Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by Lactobacillus gasseri LM19, a strain isolated from human milk. *Applied microbiology and biotechnology*, *104*(9), 3869.

Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(suppl_2), S98-S107. https://doi.org/10.1093/cid/civ072

Guerra, A. F., Lemos, W. J. F., Santos, G. O. D., Andrighetto, C., Gianomini, A., Corich, V., & Luchese, R. H. (2018). Lactobacillus paracasei probiotic properties and survivability under stress-induced by processing and storage of ice cream bar or ice-lolly. *Ciência Rural*, *48*.

H.W. Deshpande, M. T., & Bhate, M. A. (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their Exploration in Non-Dairy Probiotic Drink. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(4), 1023–1030. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.127

Hajigholizadeh, M., Mardani, K., Moradi, M., & Jamshidi, A. (2020). Molecular detection, phylogenetic analysis, and antibacterial performance of lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses, North- West Iran. *Food Science & Nutrition*, *8*(11), 6007-6013.

Hafsan, H. (2014). Bakteriosin Asal Bakteri Asam Laktat sebagai Biopreservatif Pangan. *Teknosains: Media Informasi Sains dan Teknologi*, *8*(2), 175-184. https://doi.org/10.24252/teknosains.v8i2.1905

Hassan, M. U., Nayab, H., Rehman, T. U., Williamson, M. P., Haq, K. U., Shafi, N., Shafique, F., & De Guía Córdoba, M. (2020). Characterisation of Bacteriocins Produced by Lactobacillus spp. Isolated from the Traditional Pakistani Yoghurt and Their Antimicrobial Activity against Common Foodborne Pathogens. *BioMed Research International*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/8281623

Hauge HH, Mantzilas D, Moll GN, Konings WN, Driessen AJ, Eijsink VG, Nissen-Meyer J.. (1998). Plantaricin A is an amphiphilic R-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*, *37(46)*, 16026-16032. https://doi.org/10.1021/bi981532j

Hayati, M., Herman, H., & Rezano, A. (2018). The effect of probiotic Lactobacillus casei supplementation on the secretory immunoglobulin A level in the saliva of wistar rats. *Bali Med J*, *7*(3), 727-31.

Heeney, D. D., Yarov-Yarovoy, V., & Marco, M. L. (2019). Sensitivity to the two peptide bacteriocin plantaricin EF is dependent on CorC, a membrane-bound, magnesium/cobalt efflux protein. *MicrobiologyOpen*, *8*(11), 1–16. https://doi.org/10.1002/mbo3.827

Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, *11*(4), 1-17.

https://doi.org/10.3390/ani11040979

Hilda, N. (2015). Pengaruh Pengawet Benzoat Terhadap Kerusakan Ginjal. *Keluarga Sehat Sejahtera*, *13*, 14–21. https://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/jkss/article/view/3592

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, R. P., & Ross, R. P. (2018). *The Lactobacillus casei Group : History and Health Related Applications*. *9*(September), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107

Huang, C., Li, S., Huang, L., Watanabe, K., & Anderson, A. C. (2018). *Identification and Classification for the Lactobacillus casei Group*. *9*(August), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974

Iseppi, R., Messi, P., Camellini, S., & Sabia, C. (2019). *Bacteriocin activity of Lactobacillus brevis and Lactobacillus paracasei ssp . paracasei*. , *68*(9), 1359-1366. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001045

Jabbar, Z., Ikram-ul-Haq, Mukhtar, H., Tayyeb, A., & Manzoor, A. (2020). Next-generation sequencing to elucidate adaptive stress response and plantaricin genes among Lactobacillus plantarum strains. *Future microbiology*, *15*(5), 333-348. https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0158

Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, *36*(8), 2187–2200. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007

Kareb, O., & Aïder, M. (2020). Quorum Sensing Circuits in the Communicating Mechanisms of Bacteria and Its Implication in the Biosynthesis of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: a Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*(1), 5–17. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09555-4

Karlsson, M., & Semberg, E. (2011). *Tracing probiotics in salami using PCR*. Sweden: Uppsala Universitet

Kasi, P. D., Ariandi, A., & Tenriawaru, E. P. (2019). Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Sagu dengan Gen 16S rRNA. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*, *36*(1), 35-40. https://doi.org/10.20884/1.mib.2019.36.1.924

Kaur, S., & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Frontiers in Pharmacology*, *6(11)*, 1–11. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272

Kourkoutas, Y., & Proestos, C. (2020). *Food Preservation : Challenges and E ff orts for*. 1–2.

Kumar, D., & Kalita, P. (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Foods*, *6*(1), 1–22. https://doi.org/10.3390/foods6010008

Ma, J., Yu, W., Hou, J., Han, X., Shao, H., & Liu, Y. (2020). Characterization and production optimization of a broad-spectrum bacteriocin produced by Lactobacillus casei KLDS 1.0338 and its application in soybean milk biopreservation. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 677-692. https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1751656

Mahato, S., & Shahani, A. K. (2019). Identifying the Diversity of Dominant LABs from Fermented Dairy Products Dahi and Yoghurt in Eastern Region of Nepal. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *11*, 60-64.

Maldonado- Barragán, A., & West, S. A. (2020). The cost and benefit of quorum

sensing- controlled bacteriocin production in Lactobacillus plantarum. *Journal of evolutionary biology*, *33*(1), 101-111. https://doi.org/10.1111/jeb.13551

Martín, R., Chamignon, C., Mhedbi-Hajri, N., Chain, F., Derrien, M., Escribano-Vázquez, U., ... & Langella, P. (2019). The potential probiotic Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 strain protects the intestinal barrier by stimulating both mucus production and cytoprotective response. *Scientific reports*, *9*(1), 1-14.

Maulidayanti, S., Mubarik, N. R. and S. (2019). Characterisation of a bacteriocin produced by Lactobacillus rhamnosus IN13 isolated from inasua , a fermented fish product from Central Maluku , Indonesia. *International Food Research Journal*, *26*(5), 1557–1563.

Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, *22*(8). https://doi.org/10.3390/molecules22081255

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & Lopez-Gomez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations : *Fermentation*, 1–21.

[MUI] Majelis Ulama Indonesia .2010. Fatwa Majelis Ulama Indonesia No. 01 Tahun 2010 tentang Penggunaan Mikroba dan Produk Mikrobial dalam Produk Pangan. Tersedia pada http://halalmui.org/images/stories/Fatwa/fatwa-mikroba.pdf. Diakses pada 17 Desember 2021

[MUI] Majelis Ulama Indonesia. 2013. Fatwa Majelis Ulama Indonesia No. 35 Tahun 2013 tentang Rekayasa Genetika dan Produknya. Tersedia pada https://mui.or.id/wpcontent/uploads/2017/02/No.-35-Rekayasa-Genetika-dan-Produknya.pdf Diakses pada 17 Desember 2021

Mulizar, M. (2016). Pengaruh Makanan dalam Kehidupan Manusia: Studi Terhadap Tafsir Al Azhar. *Jurnal At-Tibyan: Jurnal Ilmu Alqur'an dan Tafsir*, *1*(1), 118-142.

Mulyawati, A. I., Ardyati, T., & Jatmiko, Y. D. (2019). Partial purification and characterization of bacteriocins from Lactobacillus plantarum SB7 and Bacillus amyloliquefaciens BC9 isolated from fermented Sumbawa mare's milk as food preservative candidates. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2120, No. 1, p. 080009).

Mustopa, A. Z., Kusdianawati, Fatimah, Umami, R. N., Budiarto, R. B., & Danuri, H. (2016). Cloning and expression of plantaricin E and F genes of Lactobacillus Plantarum S34 isolated from Indonesia traditional-fermented meat (Bekasam). *International Food Research Journal*, *23*(2), 762–769.

Naeem, M., Haider, M. I. S., Baig, S., & Saleem, M. (2012). Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pak J Bot*, *44*(323), 8.

Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, *334*(1), 1-15.

Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/4374891

Nisa, K. (2020). *Analisis asam laktat, hidrogen peroksida, dan aktivitas antibakteri bakteri asam laktat transmisi Air Susu Ibu* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).

Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(2), 311–331. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526

Paramithiotis, S., Papadelli, M., Pardali, E., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2019). Evaluation of plantaricin genes expression during fermentation of Raphanus sativus roots with a plantaricin-producing Lactobacillus plantarum starter. *Current microbiology*, *76*(7), 909-916. https://doi.org/10.1007/s00284-019-01708-6

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, *13*(Suppl 1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Rakhmanova, A., Khan, Z. A., & Shah, K. (2018). A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid bacteria. *MOJ Food Process Technol*, *6*(5), 414-417. https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00197

Rau, C. H., Yudistira, A., Simbala, H. E. I. (2018). Isolasi, identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16s rrna, dan uji aktivitas antibakteri bakteri simbion endofit yang diisolasi dari alga Halimeda opuntia. *Pharmacon*, *7*(2). 53-61. https://doi.org/10.35799/pha.7.2018.19509

Refay, R. M., Abushady, H. M., Amer, S. A., & Mailam, M. A. (2020). Determination of bacteriocin-encoding genes of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of Luxor province, Egypt. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *6*(1). https://doi.org/10.1186/s43094-020-00031-3

Rizzello, C. G., Filannino, P., Di Cagno, R., Calasso, M., & Gobbetti, M. (2014). Quorum-sensing regulation of constitutive plantaricin by Lactobacillus plantarum strains under a model system for vegetables and fruits. *Applied and environmental microbiology*, *80*(2), 777-787. https://doi.org/10.1128/AEM.03224-13

Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *4*(4), 217–226. https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8

Sand, S. L., Nissen-meyer, J., Sand, O., & Haug, T. M. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Plantaricin A , a cationic peptide produced by Lactobacillus plantarum , permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *BBA - Biomembranes*, *1828*(2), 249–259. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.001

Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG-host interactions. *Microbial cell factories*, *13*(1), 1-16. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7

Sharma, V., Ranveer, R. C., Jain, N., & Aseri, G. K. (2019). Bacteriocins: Production, different strategies of purification and applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, *10*(3), 1808–1817. https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i3.1376

Shihab, M. Q. (2002) *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an, Volume I* .Jakarta: Lentera Hati.

Skerman, V. B. D., McGowan, V., and Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 225–420. doi: 10.1099/00207713-301-225

Sekarningrum, A. S., & Umar, S. (2020). Pembuatan Yoghurt Sinbiotik Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan Penggunaan Bakteri Asam Laktat dengan Penambahan Prebiotik. *Jurnal Bioindustri*, *2*(2), 476-486.

Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., ... & Siezen, R. J. (2013). Lactobacillus paracasei comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PloS one*, *8*(7), e68731.

Sogandi, Mustopa, A. Z., & Artika, I. M. (2019). The characterization of bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional fermented foods in Indonesia and the detection of its plantaricin-encoding genes. *Indonesian Journal of Biotechnology*, *24*(1), 1–7. https://doi.org/10.22146/ijbiotech.42582

Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Biron, E., Drider, D., Said, B., & Fliss, I. (2021). *Bacteriocins as a new generation of antimicrobials : toxicity aspects and regulations*. *March 2020*, 1–24. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039

Stoyancheva, G., Marzotto, M., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2014). Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal Lactobacillus strains. *Archives of microbiology*, *196*(9), 645-653. https://doi.org/10.1007/s00203-014-1003-1

Sunaryanto, R., Martius, E., & Marwoto, B. (2014). Uji kemampuan Lactobacillus casei sebagai agensia probiotik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, *1*(1), 9-14.

Syaputri, Y., & Iwahashi, H. (2020). Characteristics of heterologous plantaricin from lactobacillus plantarum and its future in food preservation. *Reviews in Agricultural Science*, *8*(October), 124–137. https://doi.org/10.7831/ras.8.0_124

Tai, H. F., Foo, H. L., Rahim, R. A., Loh, T. C., Abdullah, M. P., & I-ul, L. (2015). Molecular characterisation of new organisation of plnEF and plw loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in Lactobacillus plantarum I - UL4. *Microbial Cell Factories*, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0280-y

Thakur, M., Deshpande, H. W., & Bhate, M. A. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria and their exploration in non-dairy probiotic drink. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(4), 1023–1030. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.127

Tumbarski, Y., Lante, A., & Krastanov, A. (2018). Immobilization of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Possibilities for Application in Food

Biopreservation. *The Open Biotechnology Journal*, *12*(1), 25–32. https://doi.org/10.2174/1874070701812010025

Vasilchenko, A. S., & Rogozhin, E. A. (2019). Sub-inhibitory effects of antimicrobial peptides. *Frontiers in microbiology*, *10*(1160). 1-13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01160

Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., & Lebeer, S. (2017). Large-Scale Phylogenomics of the Lactobacillus casei Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade Associated Features. *MSystems*, *2*(4). https://doi.org/10.1128/msystems.00061-17

Xu, Y., Tian, Y., Cao, Y., Li, J., Guo, H., Su, Y., ... & Zhang, L. (2019). Probiotic properties of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei L1 and its growth performance-promotion in chicken by improving the intestinal microflora. *Frontiers in physiology*, *10*, 937.

Yu, S., Peng, Y., Zheng, Y., & Chen, W. (2015). Comparative genome analysis of Lactobacillus casei: insights into genomic diversification for niche expansion. *Indian journal of microbiology*, *55*(1), 102-107.

Zhang, L., Yu, Y., Li, X., Li, X., Zhang, H., Zhang, Z., & Xu, Y. (2017). Starch flocculation by the sweet potato sour liquid is mediated by the adhesion of lactic acid bacteria to starch. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1412.

Zhao, R., Lu, Y., Ran, J., Li, G., Lei, S., Zhu, Y., & Xu, B. (2020). Food Bioscience Purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus rhamnosus zrx01. *Food Bioscience*, *38*(July 2019), 100754. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100754

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. 2020(70), 2782–2858. https://doi.org/10.7939/r3-egnz-m294

LAMPIRAN

Lampiran 1. Formula Pembuatan Buffer TE pH 8

Buffer Formulation *BIO-RAD*

1M Tris-HCl pH 8 (25 ml)

Tris base	3,0285 g
Akuades	15 ml
HCl	mencapai pH 8
Akuades	mencapai batas 25 ml

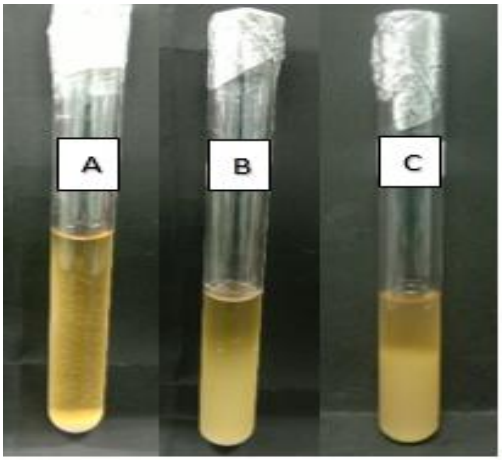
0,5M EDTA pH 8 (25 ml)

EDTA	4,652 g
Akuades	15 ml
NaOH	mencapai pH 8
Akuades	mencapai batas 25 ml

Buffer TE pH 8 (100 ml)

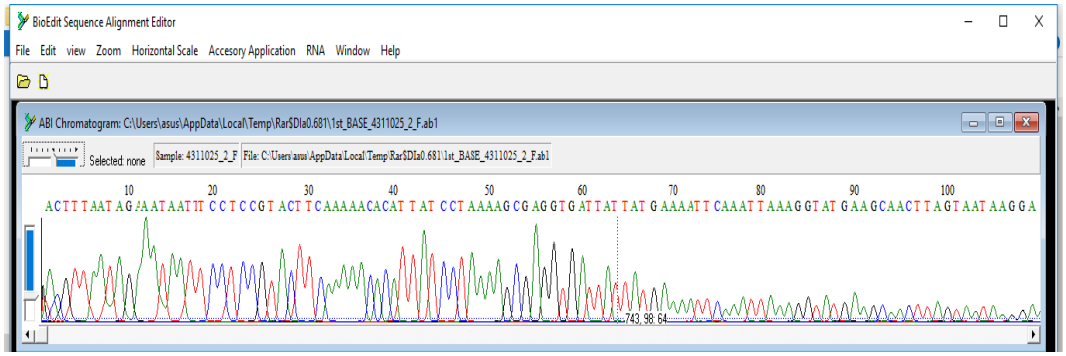
1M Tris-HCl pH 8	1 ml
0,5M EDTA pH 8	0,2 ml
Akuades	mencapai batas 100 ml
Sterilisasi di autoklaf	

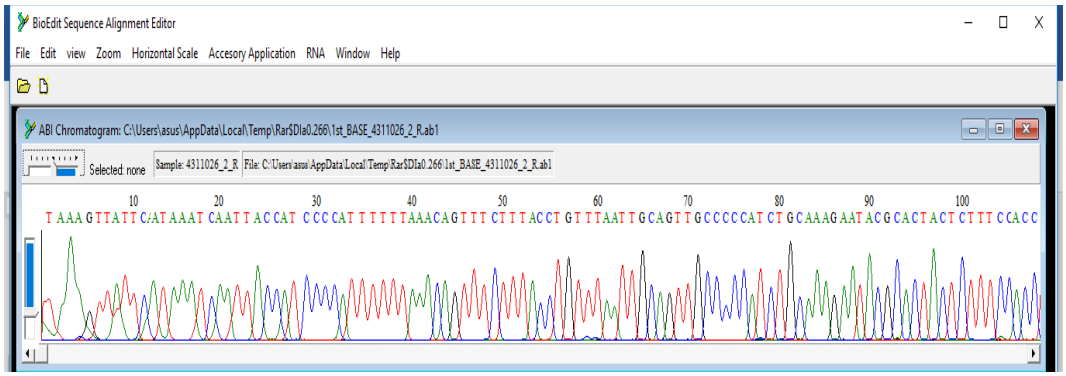
Lampiran 2. Hasil Pertumbuhan Kelompok *L. casei* di MRSB



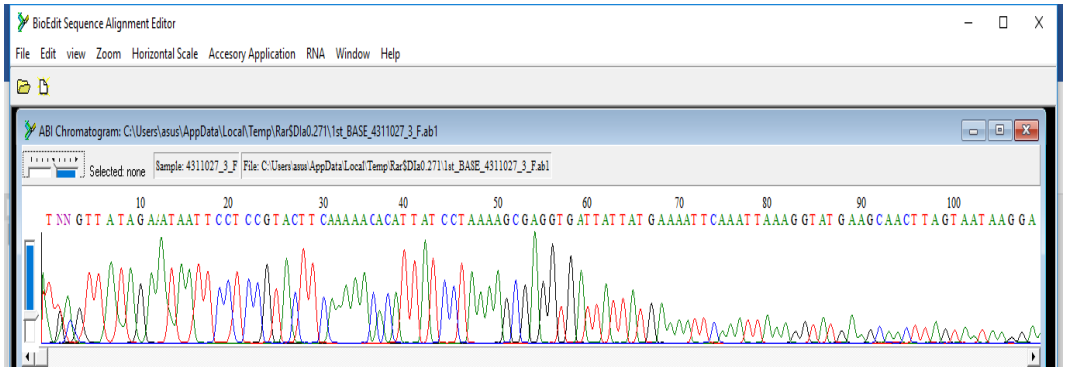
Keterangan: Pertumbuhan kelompok *L. casei*. A: *L. casei*; B: *L. paracasei*; C: *L. rhamnosus*

Lampiran 3. Hasil Sekuensing *L. casei*

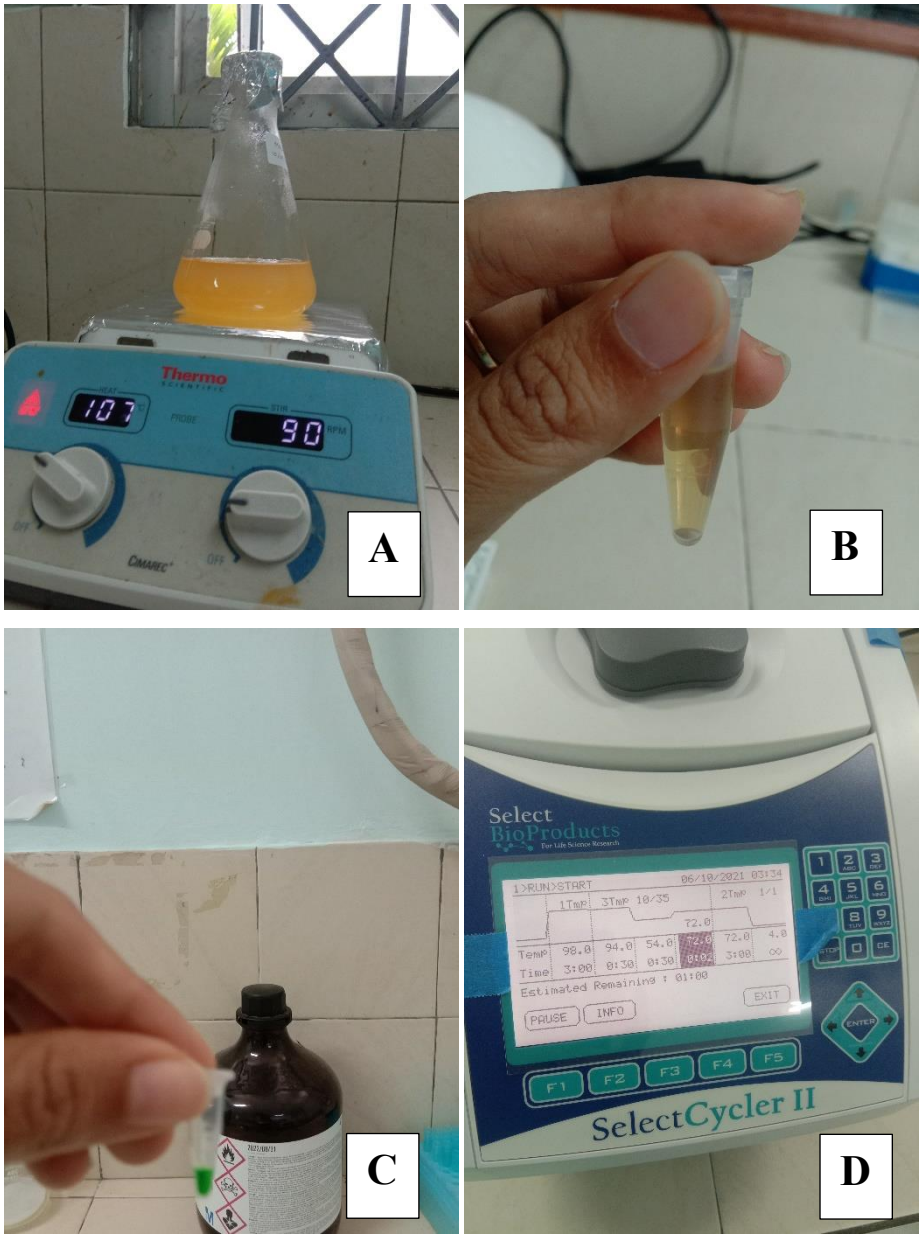


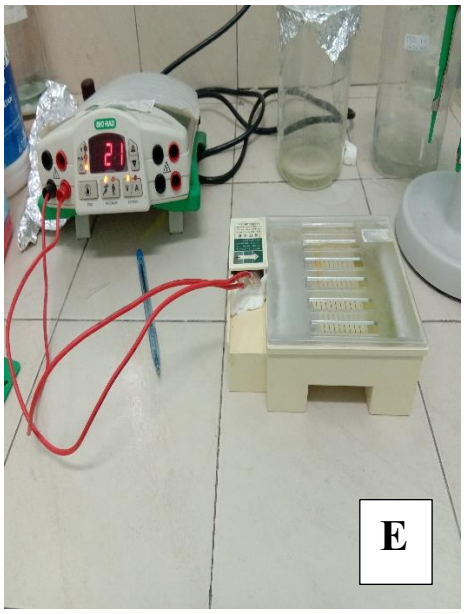


Lampiran 4. Hasil Sekuensing *L. paracasei*



Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian





Keterangan : A. Pembuatan media pertumbuhan, B. Hasil sentrifugasi sel bakteri, C. Pembuatan reaksi PCR, D. Proses amplifikasi PCR, E. Proses elektroforesis, D. Visualisasi hasil elektroforesis dengan Gel-doc

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Salma Ainu Nisa
NIM : 17620083
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2021/2022
Pembimbing : Dr. Nur Kusmiyati, M, Si
Judul Skripsi : Deteksi Gen Plantarisin A Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	1-3-2021	Konsutasi judul skripsi	
2	5-4-2021	Konsutasi Bab I, Bab II, Bab III	
3	18-4-2021	Revisi Bab I, Bab II, Bab III	
4	3-5-2021	Revisi Bab I, Bab II, Bab III	
5	10-5-2021	ACC proposal Bab I, Bab II, Bab III	
6	26-7-2021	Revisi proposal Bab I, Bab II, Bab III	
7	1-9-2021	Konsultasi penelitian	
8	11-11-2021	Konsultasi hasil	
9	29-11-2021	Konsultasi naskah skripsi Bab I, II, III, IV,V	
10			

Malang, 30 November 2021

Pembimbing Skripsi,

Dr. Nur Kusmiyati, M.Si
NIP. 197410182003122002

Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 198908162016080120 61

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Salma Ainu Nisa
NIM : 17620083
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2021/2022
Pembimbing : Dr. M. Mukhis
Judul Skripsi : Deteksi Gen Plantarisin A Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	12-5-2021	Konsultasi integrasi sains dan islam Bab I dan Bab II	
2	21-5-2021	Acc integrasi sains dan islam Bab I dan Bab II	
3	24-11-2021	Konsultasi integrasi sains dan islam Bab I ,II, III	
4	30-11-2021	Konsultasi integrasi sains dan islam	
5	30-11-2021	Acc integrasi sains dan islam	
6			
7			
8			
9			
10			

Malang, 30 November 2021
Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 197410182003122002

Pembimbing Skripsi,

Dr. M. Mukhlis Fahruddin, M.S.I
NIPT. 201402011409

NIDT. 201402011409 NIP. 19741018 200312 2 002

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

Form Checklist Plagiasi

Nama : Salma Ainu Nisa
NIM : 17620083
Judul Skipsi : Deteksi Gen *Plantarisin A* Pengkode Bakteriosin pada Kelompok *Lactobacillus casei*

No	Tim Check Plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	15%	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002