

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PTUPT)**



**DIVERSIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
BAKTERIOSIN SEBAGAI FEED ADDITIVE UNTUK MEMODULASI  
IMMUNOGLOBULIN DAN PENINGKATAN PERFORMAN  
PRODUKSI**

**TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Dr. Widya Paramita Lokapirnasari, drh., MP    NIDN 0010116907**

**Dr. Adriana Monica Sahidu, Ir.,MKes        NIDN 0016116105**

**Dr.Lilik Maslachah,M.Kes.,drh            NIDN 0031036801**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PTUPT)**



kfc  
kk  
LP24/19  
Lok  
d

**DIVERSIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
BAKTERIOSIN SEBAGAI FEED ADDITIVE UNTUK MEMODULASI  
IMMUNOGLOBULIN DAN PENINGKATAN PERFORMAN  
PRODUKSI**

**TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Dr. Widya Paramita Lokapirnasari, drh., MP    NIDN 0010116907**  
**Dr. Adriana Monica Sahidu, Ir.,MKes        NIDN 0016116105**  
**Dr. Lilik Maslachah, M.Kes., drh            NIDN 0031036801**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**





**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : Diversifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakriosin Sebagai Feed Additive Untuk Memodulasi Immunoglobulin dan Peningkatan Performan Produksi

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : drh.. Dr WIDYA PARAMITA LOKAPIRNASARI, M.P  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
 NIDN : 0010116907  
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 Program Studi : Kedokteran Hewan  
 Nomor HP : 085731469579  
 Alamat surel (e-mail) : widya-p-1@fkh.unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. Ir ADRIANA MONICA SAHIDU M.Kes  
 NIDN : 0016116105  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : Dr. drh. LILIK MASLACHAH S.KH, M.Kes  
 NIDN : 0031036801  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**

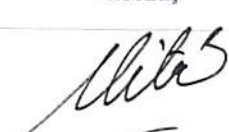
Nama Institusi Mitra : -  
 Alamat : -  
 Penanggung Jawab : -  
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun  
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 90,000,000  
 Biaya Keseluruhan : Rp 440,000,000

Mengetahui,  
 Dekan FKH Unair



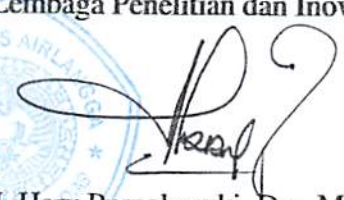
(Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., drh)  
 NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018  
 Ketua,



(drh.. Dr WIDYA PARAMITA LOKAPIRNASARI, M.P)  
 NIP/NIK 196911101997032001

Menyetujui,  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D)  
 NIP/NIK 196705071991021 001



## RINGKASAN

Sesuai dengan UU no 18 tahun 2009 *juncto* no 41 tahun 2014 tentang peternakan dan kesehatan hewan pasal 22 ayat 4C yang menyebutkan bahwa melarang menggunakan pakan yang dicampur hormon tertentu dan/atau antibiotic imbuhan pakan. *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) diindikasikan memiliki efek negatif antara lain dapat menimbulkan residu dalam daging dan produk hewani lainnya, resistensi bakteri terhadap antibiotik serta terjadinya resistensi silang antara antibiotika dalam satu golongan. Pemberlakuan peraturan larangan penggunaan AGP tersebut harus diikuti dengan jaminan ketersediaan alternatif penggantinya. Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan pengembangan penelitian yang bertujuan untuk menghasilkan alternatif pengganti AGP. Indonesia memiliki diversitas hayati yang tinggi termasuk diantaranya diversitas bakteri yang berpotensi memproduksi bakteriosin sehingga keanekaragaman bakteri ini perlu dieksplorasi potensinya untuk dikembangkan serta diaplikasikan pada ternak sebagai sumber probiotik.

**Tujuan jangka panjang** yang akan dicapai pada penelitian ini adalah menghasilkan produk probiotik bakteri asam laktat (BAL) yang memiliki kemampuan menghasilkan bakteriosin, serta mampu berperan sebagai probiotik karena memiliki ketahanan terhadap keasaman, garam empedu serta aktivitas bakteriosin terhadap bakteri patogen serta meningkatkan produk ternak yang aman dikonsumsi untuk menunjang ketahanan pangan.

**Target khusus** yang ingin dicapai adalah menghasilkan probiotik BAL yang berfungsi sebagai alternatif pengganti *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) yang memiliki kemampuan menghasilkan bakteriosin, memiliki ketahanan terhadap keasaman, garam empedu, memiliki kemampuan terhadap bakteri patogen, serta meningkatkan imunitas pada ternak.

**Metode tahun kedua** yang digunakan dalam pencapaian tujuan penelitian ini terdiri dari 5 tahap: Identifikasi gen pengkode 16S DNA: 1. Isolasi DNA. 2. Amplifikasi DNA dengan PCR isolasi bakteri asam laktat (BAL) yang menghasilkan bakteriosin, 3. Sequencing. 4. Phylogenetic tree, 5. *uji antibiotica sensitivity test*. Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat dihasilkan probiotik yang berperan sebagai alternatif pengganti *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) yang aman digunakan untuk ternak dan hasil produksinya yang akan dikonsumsi oleh manusia.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dicapai pada tahun kedua dari rencana tiga tahun maka dapat disimpulkan bahwa: dapat diidentifikasi gen pengkode 16S DNA isolat bakteri asam laktat, dapat dihasilkan *phylogenetic tree* berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA, dapat dibuktikan adanya bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL, dapat dibuktikan kemampuan bakteriosin dari isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri enteric pathogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Probiotic, *phylogenetic tree*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*



## **PRAKATA**

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas karuniaNya, kami tim penelitian telah mampu melaksanakan Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) dengan judul **“DIVERSIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL BAKTERIOSIN SEBAGAI FEED ADDITIVE UNTUK MEMODULASI IMMUNOGLOBULIN DAN PENINGKATAN PERFORMAN PRODUKSI”**

Rasa terima kasih kami sampaikan kepada Kemenristekdikti, Rektor Unair, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas pendanaan pada program PTUPT Tahun 2018.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Prakata	iv
Daftar Isi	v
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Tujuan Khusus	3
1.3 Urgensi (Keutamaan Penelitian)	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	11
3.1 Tujuan	11
3.2 Manfaat	11
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
4.1 Rancangan penelitian	12
4.2 Sampel Penelitian	12
4.3 Bahan Penelitian	12
4.4 Instrumen Penelitian	13
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	13
4.6 Prosedur dan pengumpulan data	14
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	18
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	57
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	62
Referensi	63
Lampiran	67



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
1	Produk isolat kandidat probiotik yang memiliki kemampuan penghasil anti mikroba (bakteriosin)	67
2	Pemakalah Seminar International	68
3	Pendaftaran HKI Merek	69
4	Publikasi International	70



## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Sesuai dengan UU no 18 tahun 2009 *juncto* no 41 tahun 2014 tentang peternakan dan kesehatan hewan pasal 22 ayat 4C yang menyebutkan bahwa melarang menggunakan pakan yang dicampur hormon tertentu dan/atau antibiotik imbuhan pakan. *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) yang banyak digunakan untuk memacu produksi tersebut, diindikasikan memiliki efek negatif antara lain dapat menimbulkan residu dalam daging dan produk hewani lainnya yang dapat berpengaruh terhadap kesehatan konsumen, resistensi bakteri terhadap antibiotik serta terjadinya resistensi silang antara antibiotika dalam satu golongan.

Beberapa negara telah menerapkan kebijakan pembatasan penggunaan antibiotik dalam pakan ternak seperti di Swedia tahun 1986, Denmark tahun 1995. Komisi Masyarakat Uni Eropa sejak tanggal 1 Januari 2006 (Regulasi No. 1831/2003), menetapkan penggunaan antibiotik misalnya Zn-Bacitracin, Avilamycin, Spiramycin, Avoparcin, Virginiamycin, Carbadox, Olaquinox, Salinomycin Flavomycin, dan Monensin tidak dapat digunakan dalam ransum ternak (Cogliani et al. 2011; Mackie 2011). Kebijakan untuk pengurangan penggunaan antibiotik pada ternak hanya dapat dicapai jika strategi antimikroba alternatif telah tersedia.

Penggunaan antibiotik ini mulai dibatasi karena memberikan dampak permasalahan yang serius, yaitu ditemukannya residu antibiotik dalam karkas ternak yang akhirnya dapat meningkatkan prevalensi kasus penyakit infeksi yang resistan terhadap antibiotik pada manusia (Revington, 2002). Residu antibiotik akan terbawa dalam produk-produk ternak seperti daging, telur, dan susu, dan akan berbahaya bagi konsumen yang mengkonsumsinya. Berdasarkan hasil penelitian diketahui dari 80 ekor broiler di Jabodetabek, diindikasikan 85 % daging broiler dan 37 % hati ayam tercemar residu antibiotik *tylosin*, *penisilin*, *oxytetracycline* dan *kanamycin* (Regar dkk, 2014).

*Growth-promotor antibiotik* (GPA) yang banyak digunakan untuk memacu produksi, mulai dilarang penggunaannya karena diindikasikan memiliki efek negatif antara lain dapat menimbulkan residu dalam daging dan produk hewani lainnya yang dapat berpengaruh terhadap kesehatan konsumen serta resistensi terhadap antibiotik tersebut (Kompiang, 2002;





Rahayu, 2011). Hal ini membuka peluang untuk melakukan diversifikasi berbagai jenis mikroba probiotik dalam pakan ternak untuk menggantikan fungsi menguntungkan dari antibiotik.

Indonesia memiliki diversitas hayati yang tinggi termasuk diantaranya diversitas bakteri yang berpotensi memproduksi bakteriosin sehingga keanekaragaman bakteri ini perlu dieksplorasi potensinya untuk dikembangkan serta diaplikasikan pada ternak sebagai sumber probiotik. Sebagai pengganti antibiotik, saat ini banyak dikembangkan probiotik yang berfungsi menekan pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan dengan memproduksi senyawa anti mikroba bagi bakteri patogen. Senyawa tersebut merupakan hasil metabolisme bakteri probiotik tersebut antara lain asam laktat, asam asetat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bakteriosin, dan reuterin.

Hampir pada semua hewan, probiotik berperan meningkatkan konsumsi pakan. Kondisi tersebut dikarenakan meningkatnya daya cerna makanan oleh hewan yang menyebabkan saluran pencernaan cepat kosong sehingga dapat dicapai efisiensi pakan. Probiotik selain berperan pada peningkatan konsumsi pakan juga dapat meningkatkan laju pertumbuhan sehingga berperan pada penurunan angka konversi pakan (Soeharsono, 2010). Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik antara lain dari golongan *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*. *Lactobacillus casei* digunakan sebagai probiotik karena mampu menghambat dan membunuh bakteri patogen serta memiliki efek anti tumor yang lebih kuat dibandingkan bakteri probiotik lainnya (Margawani, 1995). bahwa probiotik yang diberikan pada ayam dapat terdiri dari hanya satu macam *strain* mikroba atau dalam bentuk campuran terdiri dari beberapa *strain* mikroba. Pemberian probiotik pada ternak unggas dapat diberikan dalam bentuk campuran pakan atau diberikan melalui air minum Jaya (2012).

Mukosa hewan merupakan bagian dari organ yang kontak pertama kali dengan benda asing, termasuk antigen. Pada mukosa terbentuk suatu mekanisme untuk melawan antigen. Pada saluran cerna sistem imun mukosal disebut *gut associated lymphoid tissue* (GALT). GALT terdiri dari organ-organ maupun sel-sel imun yang banyak dijumpai pada *epithelial layer* dan *lamina propria*. Sel-sel imun yang ada pada GALT bersifat sebagai *inducer*, *immunoregulator* dan *effector*. Pada ayam, GALT dan limpa merupakan organ utama untuk menginduksi terbentuknya respon imun (Shira and Frieman, 2005).

Antigen yang masuk melalui saluran pencernaan akan mengaktivasi sel Th dan sel B yang merupakan prekursor dari Ig A. Ig A banyak ditemukan di *payer patch's* dan akan bermigrasi ke *mucosal effector sites*, misal lamina propia intestine. Pada *mucosal effector sites* banyak dijumpai sel T dan sel B, serta sel plasma yang akan mensekresi Ig A. Struktur intraepithelial mukosa saluran cerna memungkinkan sekresi Ig A keluar dari sel menuju pembuluh darah atau jaringan yang lain (Lillehoj and Trout, 2008).

Indonesia memiliki diversitas hayati yang tinggi termasuk diantaranya diversitas bakteri yang berpotensi memproduksi bakteriosin sehingga keanekaragaman bakteri ini perlu dieksplorasi potensinya untuk dikembangkan serta diaplikasikan pada ternak sebagai sumber probiotik. Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut di atas serta sesuai dengan rencana induk penelitian (RIP) Unair di bidang ketahanan pangan, yaitu sejalan dengan pengembangan bioteknologi, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk menghasilkan pengembangan produksi probiotik untuk pakan ternak setelah melalui isolasi dan identifikasi probiotik serta pengujian penggunaan probiotik untuk peningkatan kualitas pakan unggas sehingga dapat mewujudkan ketahanan pangan.

## 1.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

Tahun kedua:

1. Membuktikan kemampuan isolat BAL pada uji antibiotika sensitivity test
2. Mengidentifikasi isolat dengan VITEK 2 *microbial identification system*
3. Mengisolasi DNA isolat BAL
4. Mengidentifikasi gen pengkode 16S DNA isolat bakteri asam laktat
5. Menghasilkan *phylogenetic tree* berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA.
6. Membuktikan adanya bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL
7. Membuktikan kemampuan bakteriosin dari isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri enteric pathogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

**Tahun ketiga:**

1. Membuktikan dosis optimum tertentu dari isolat bakteri asam laktat untuk peningkatan kualitas pakan.
2. Membuktikan pengaruh formula pakan dengan penambahan isolat bakteri asam laktat terhadap peningkatan *feed efficiency* pada ayam yang diinfeksi *Escherichia coli*.
3. Membuktikan pengaruh formula pakan dengan penambahan isolat bakteri asam laktat penghasil bakteriosin terhadap peningkatan performan pertumbuhan pada ternak ayam *protein efficiency ratio* (PER) pada ayam yang diinfeksi *Escherichia coli*.
4. Membuktikan pengaruh formula pakan dengan penambahan isolat bakteri asam laktat terhadap perbaikan *feed conversion ratio* (FCR) pada ayam yang diinfeksi *Escherichia coli*.
5. Membuktikan pengaruh formula pakan dengan penambahan isolat bakteri asam laktat penghasil bakteriosin terhadap peningkatan *hen day productin* (HDP) pada ayam yang diinfeksi *Escherichia coli*

**1.3 Urgensi (keutamaan) penelitian.**

Sesuai dengan roadmap penelitian Universitas Airlangga pada tema riset di bidang ketahanan pangan, yaitu bioteknologi nutrisi, yang mengkaji penggunaan probiotik dalam pengolahan pakan ternak untuk meningkatkan nutrisi pakan, mendapatkan isolat probiotik, produksi formula pakan ternak, serta menghasilkan paten merk dari isolate probiotik, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk menghasilkan pengembangan produksi probiotik untuk pakan ternak setelah melalui isolasi dan identifikasi probiotik serta pengujian penggunaan probiotik untuk peningkatan kualitas pakan unggas sehingga dapat mewujudkan ketahanan pangan.

Temuan yang dihasilkan dari penelitian ini adalah isolat bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan menghasilkan bakteriosin untuk dikembangkan dan digunakan lebih lanjut sebagai produk probiotik. Luaran dari hasil penelitian ini adalah publikasi ilmiah international, pemakalah seminar nasional dan internasional, HKI merk dagang serta produk



probiotik BAL sebagai pengganti *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) serta dapat meningkatkan kualitas pakan ternak dan meningkatkan imunitas ternak.

Kontribusi hasil penelitian ini pada ilmu pengetahuan yang dalam hal ini terkait langsung dengan riset unggulan perguruan tinggi pengusul adalah mendukung tercapainya rencana strategis penelitian untuk mewujudkan bidang ketahanan pangan.

Rencana capaian tahunan tercantum pada Tabel 1 sesuai luaran yang ditargetkan dan lamanya penelitian yang akan dilakukan.

**Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan**

No	Jenis Luaran		Indikator		
			Capaian	TS+1	TS+2
1	Artikel ilmiah dimuat di jurnal <sup>2)</sup>	Internasional bereputasi	<i>published</i>	<i>accepted</i>	submit
		Nasional Terakreditasi			
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding ilmiah <sup>3)</sup>	Internasional terindeks	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	terdaftar
		Nasional			
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah <sup>4)</sup>	Internasional			
		Nasional			
4	<i>Visiting Lecturer</i> <sup>5)</sup>	Internasional			
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) <sup>6)</sup>	Paten			
		Paten sederhana			
		Hak Cipta			
		Merek dagang	terdaftar	terdaftar	terdaftar
		Rahasia dagang			
		Desain Produk Industri			
		Indikasi Geografis			

		Perlindungan Varietas Tanaman			
		Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu			
6	Teknologi Tepat Guna <sup>7)</sup>		produk	produk	produk
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>8)</sup>				
8	Bahan Ajar <sup>9)</sup>				draft
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>10)</sup>		4	5	6

- 1) TS = Tahun sekarang (tahun pertama penelitian)
- 2) Isi dengan tidak ada, draf, *submitted*, *reviewed*, *accepted*, atau *published*
- 3) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- 4) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- 5) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan
- 6) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau *granted*
- 7) Isi dengan tidak ada, draf, produk, atau penerapan
- 8) Isi dengan tidak ada, draf, produk, atau penerapan
- 9) Isi dengan tidak ada, draf, proses *editing*, atau sudah terbit
- 10) Isi dengan skala 1-9 dengan mengacu pada Bab 2 Tabel 2.7

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Bakteri Asam laktat (BAL)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi *Lactobacillus casei* WPL 415. Isolat bakteri asam laktat *Lactobacillus casei* WPL 415 yang diperoleh dari usus halus sapi pada Rumah Potong Hewan Surabaya, memiliki karakteristik sebagai berikut: sel berbentuk batang, bersifat Gram positif serta motilitas positif. Hasil pemeriksaan uji biokimiawi dengan VITEK 2 *microbial identification system version: 05.01* (BioMérieux) pada isolat *Lactobacillus casei* WPL 415 menunjukkan kemampuan memanfaatkan glukose, lactose, sucrose, galaktose, ribose serta selubiose dan xylose. Isolat ini juga mampu tumbuh pada kadar NaCl 6.5%. Alpha-galactosidase, Beta-Galactosidase positif, Alpha-Glucosidase positif, Beta-Xylosidase positif. Susunan nukleotida isolat *Lactobacillus casei* WPL 415 yang diperoleh, telah diidentifikasi dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dalam [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com) dan didapatkan isolat yang mempunyai kemiripan susunan nukleotida dengan tingkat kemiripan 92%-88% (Lokapirnasari dan Sahidu, 2015). *Lactobacillus casei* WPL 415 merupakan isolat hasil penelitian pengusul yang tahan terhadap asam dan garam empedu merupakan bakteri indigenous yang dapat mengendalikan mikroba pencernaan sehingga dapat mempengaruhi sistem kekebalan pada saluran pencernaan.

Sejumlah probiotik menghasilkan enzim yang diperlukan untuk membantu proses pencernaan substrat bahan makanan tertentu dalam saluran pencernaan, antara lain *Lactobacillus* yang menghasilkan enzim selulase yang membantu proses pencernaan. Enzim ini mampu memecah komponen serat kasar yang merupakan komponen yang sulit dicerna dalam saluran pencernaan ternak unggas. Saat ini penggunaan bahan makanan ternak (pakan) untuk unggas kebanyakan berasal dari limbah industri atau limbah pertanian yang pada umumnya mengandung serat kasar tinggi. Penggunaan mikroba-mikroba probiotika yang menghasilkan enzim selulase mampu memanfaatkan makanan berserat kasar tinggi dari limbah industri dan pertanian tersebut, dan mikroba probiotika membantu proses pencernaan sehingga serat kasar dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhan jaringan dan peningkatan penambahan bobot badan (Sumarsih et al, 2012). Sejumlah probiotik telah memperlihatkan kemampuan





menempel yang kuat pada sel-sel usus manusia seperti *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* dan sejumlah besar *Bifidobacteria* (McNaught dan MacFie, 2000).

*Lactobacillus* merupakan genus bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, non motile, anaerob fakultatif, katalase negatif, koloninya dalam media agar berukuran 2-5 mm, sedikit transparan, tidak berpigmen dan metabolit utamanya adalah asam laktat. Tumbuh baik pada suhu 25°C sampai 40°C dan tersebar luas di lingkungan terutama dalam produk pangan asal hewan dan sayuran. Bakteri *Lactobacillus* menetap dalam saluran pencernaan unggas dan mamalia (Ray and Bhunia, 2008). Asam laktat yang dihasilkan *Lactobacillus* menyebabkan lingkungan menjadi asam sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. *Lactobacillus* merupakan kelompok bakteri heterogenus yang terdiri atas 135 spesies dan 27 subspecies (Bernardeau *et al.*, 2008).

Isolat *Lactobacillus casei* WPL 415 yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya tersebut, selanjutnya akan digunakan sebagai salah satu indikator bakteri asam laktat pada pengujian kemampuan aktivitas bakteriosin. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan produk probiotik asam laktat yang mampu menghasilkan bakteriosin untuk diuji lebih lanjut kemampuannya terhadap peningkatan kualitas pakan ternak dan menguji kemampuannya terhadap peningkatan imunitas sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai probiotik yang berperan sebagai imunostimulan.

#### ***Lactobacillus plantarum* WPL 117**

Berdasarkan hasil biomassa (berat sel kering) (mg/100 mL), isolat WPL 117 pada media MRS broth control menghasilkan biomassa sebesar 50.2 mg/100 mL. Selanjutnya bila dibandingkan dengan perlakuan yaitu pada pengujian ketahanan terhadap keasaman (pH), hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 menghasilkan biomassa sebesar 50.1 mg/100 mL pada pH 2 dan 49.9 mg/100 mL pada pH 4. Berdasarkan hasil uji ketahanan terhadap garam empedu, isolat WPL 117 pada media MRS broth kontrol menghasilkan biomassa sebesar 50.2 mg/100 mL, sedangkan pada media MRS broth *Ox bile salt* hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 menghasilkan biomassa sebesar 22.6 mg/100 mL. Berdasarkan hasil pengukuran pertumbuhan diameter zona hambat (mm) terhadap keasaman dan garam empedu, maka hasil

penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 pada pH 2 menunjukkan hasil sebesar 0 mm, pH 4 sebesar 0 mm serta terhadap *Ox bile Salt* sebesar 11.5 mm.

### ***Lactococcus sp WPL 317***

Berdasarkan hasil uji morfologi, diketahui bahwa isolat kode WPL 317 berbentuk coccus, sedangkan berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat tersebut bersifat Gram +. Berdasarkan hasil uji survival terhadap *Ox bile salt* pada isolat *Lactococcus sp WPL 317*, biomassa (berat sel kering) (mg/100 mL), isolat WPL 317 pada media MRS broth control menghasilkan biomassa sebesar 44.8 mg/100 mL. Selanjutnya bila dibandingkan dengan perlakuan yaitu pada pengujian ketahanan terhadap keasaman (pH), hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 317 menghasilkan biomassa sebesar 36.3 mg/100 mL pada pH 2 dan 38.2 mg/100 mL pada pH 4. Berdasarkan hasil pengukuran pertumbuhan diameter zona hambat (mm) terhadap keasaman dan garam empedu, maka hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 317 pada pH 2 menunjukkan hasil sebesar 0 mm, pH 4 sebesar 0 mm serta terhadap *Ox bile Salt* sebesar 9 mm

## **2.2. Immunoglobulin**

Imunoglobulin A merupakan imunoglobulin utama yang ditemukan pada mukosa sehingga IgA disebut juga sebagai *secretory immunoglobulin A (sIgA)* karena IgA yang terbentuk akan keluar masuk dalam lumen atau sistem peredaran darah yang selanjutnya akan memacu pembentukan IgG dan IgM. Bakteri probiotik memproduksi IgA sekitar 80% yang ada dalam mukosa usus/ lamina propia usus (Galdeano *et al*, 2007). Bakteri probiotik akan memacu aktivasi sel imunokompeten baik makrofag maupun sel dendrit sehingga jaringan limfoid yang ada dalam lamina propia akan memicu sel plasma untuk memproduksi IgA yang berperan dalam sistem imun mukosa. Masuknya antigen peroral akan merangsang terbentuknya IgA, yang dapat keluar masuk dalam lumen usus atau peredaran darah. Lipopolisakarida (LPS) yang dihasilkan oleh bakteri gram negatif yang merupakan bagian luar dinding sel yang berupa toksin/ endotoksin, yang dapat menginduksi terjadinya sepsis. Patofisiologis sepsis dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara sitokin proinflamasi dan antiinflamasi. Produksi sitokin proinflamasi akan menyebabkan peningkatan apoptosis epitel

saluran pencernaan yaitu sel efektor imunologis termasuk sel limfosit dan sel dendrit yang akan menurunkan produksi imunoglobulin Presetyo (2010).

Probiotik diketahui dapat meningkatkan status kekebalan tubuh inang dengan menstimulasi melalui jalur spesifik dan nonspesifik. Hal ini melibatkan modifikasi imunitas humoral, seluler, dan nonspesifik. Beberapa peneliti melaporkan efek positif *in vivo* yang dapat memperkuat produksi mukus, aktivasi makrofag dengan keberadaan *Lactobacillus*, stimulasi IgA sekretori, peningkatan proinflamasi, produksi sitokin dan peningkatan produksi imunoglobulin perifer (Villena *et al.* 2008). Pemberian probiotik berbasis pada konsep mikroflora yang menyetatkan.

Probiotik dapat membantu menstabilkan mikrobia usus dan permeabilitas barrier usus serta meningkatkan sistem dan respon mukosal IgA yang mendukung kesiapan barrier mukosa usus terhadap serangan infeksi mikrobia yang merugikan dan menyebabkan infeksi. Bakteri asam laktat (*L. Acidophilus*, *L. Casei* dan *L. Bulgaricus*) mampu memicu pertumbuhan dan enstimulasi pembentukan sel-sel limfosit (Balevi *et al.*, 2001).



### BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

#### 3.1. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengidentifikasi gen pengkode 16S DNA isolat bakteri asam laktat.
2. Menghasilkan *phylogenetic tree* berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA.
3. Membuktikan adanya bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL.
4. Membuktikan kemampuan bakteriosin dari isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri enteric pathogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2. Manfaat

Sesuai dengan roadmap penelitian Universitas Airlangga pada tema riset di bidang ketahanan pangan, yaitu bioteknologi nutrisi, yang mengkaji penggunaan probiotik dalam pengolahan pakan ternak untuk meningkatkan nutrisi pakan, mendapatkan isolat probiotik, produksi formula pakan ternak, serta menghasilkan paten merk dari isolate probiotik, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk menghasilkan pengembangan produksi probiotik untuk pakan ternak setelah melalui isolasi dan identifikasi probiotik serta pengujian penggunaan probiotik untuk peningkatan kualitas pakan unggas sehingga dapat mewujudkan ketahanan pangan.

Manfaat dari penelitian ini adalah adanya isolat bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan menghasilkan bakteriosin untuk dikembangkan dan digunakan lebih lanjut sebagai produk probiotik. Kontribusi hasil penelitian ini pada ilmu pengetahuan yang dalam hal ini terkait langsung dengan riset unggulan perguruan tinggi pengusul adalah mendukung tercapainya rencana strategis penelitian untuk mewujudkan bidang ketahanan pangan.





## BAB 4. METODE PELAKSANAAN

### 4.1 Rancangan penelitian

Penelitian tahun kedua untuk mengetahui kemampuan isolat yang dihasilkan pada penelitian tahun pertama terhadap uji antibiotika sensitivty tes, membuktikan kemampuan aktivitas bakteriosin terhadap bakteri enteric patogen, isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR serta sequencing untuk mengetahui *phylogenetic tree* berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA .

### 4.2 Sampel Penelitian

Mikroba yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat bakteri yang diisolasi dari intestine sapi yang diperoleh dari RPH Surabaya.

### 4.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian tahun pertama,

Alat yang digunakan pada isolasi BAL adalah Beaker glas, tabung reaksi, cawan Petri, tabung Durham, tabung sentrifuge, tabung Erlenmeyer, pipet 1 ml, 5 ml, 10 ml, glas obyek, mikroskop, bak plastik, Ose, Automatic Labo-Mixer (Vortex), sentrifuger, rak tabung, mikropipet, tip pipet, inkubator, pH-meter.

Bahan yang digunakan adalah usus sapi, MRS-Broth (Oxoid CM-0359), Bacto-Agar (Oxoid), Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Oxoid), NaOH 1N, NaCl fisiologis, akuades steril, alkohol 70%, bakteri indikator *Lactobacillus casei* WPL 415 (stok hasil penelitian pengusul sebelumnya), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Tahun kedua: Isolasi DNA: Buffer TE 50 mM (50 mM tris Cl (pH 8.0); 50 mM EDTA), *Lisozyme* 10 mg/mL, Buffer STEP(SDS 0,5%, 50 mM tris Cl (pH 8.0), 0,4 M EDTA, Proteinase K), Phenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1), Na-asetat 3M, Etanol absolut dingin, Etanol 70%, *Distilled water*.

Amplifikasi gen penyandi 16S DNA: dNTP 2,0 µl, Buffer 2,5µl, MgSO<sub>4</sub> 1,0 µl, DNA template 2,0 µl, *Primer Forward* PB 36 (10 pmol) 1,0 µl, *Primer Reverse* PB 38 (pmol) 1,0 µl, Enzim *Highfidelity taq Polymerase*) 0,2 µl, *Distilled water* 10,3 µl. Deteksi produk PCR dengan elektroforesis : Agarosa, Buffer TBE (Tris base/ boric acid / EDTA) 0,5X, Etidium bromide.

Bahan yang digunakan dalam penelitian tahun kedua, meliputi bahan kimia yang digunakan untuk pembuatan stok kultur antara lain pepton water 0,1 % susu skim 10%, MSG 1% serta gliserol 20%. Untuk uji antagonis terhadap mikroba patogen enteric digunakan media MRSB/de Man Rogosa and Sharp Broth (Oxoid), media nutrient agar (NA, Oxoid) dan nutrient broth (NB, Oxoid). Media yang digunakan untuk pengujian ketahanan terhadap asam adalah MRSB (Oxoid), MRSA (Oxoid), NaCl 0,85% steril serta HCl. Media yang digunakan untuk pengujian terhadap garam empedu antara lain MRSB (Oxoid), MRSA (Oxoid), NaCl 0,85% steril serta oxgall (Oxoid).

#### 4.4 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan: pipet volum 1ml, cawan petri, tabung reaksi, autoklaf, spatel, pengaduk, Erlenmeyer, bunsen, rak tabung reaksi, termos es, Mikropipet (*Eppendorf*), *thermal cycler*/ alat PCR (Perkin Elmer), *microwave* (Sanyo), *microcentrifuge* (Joul), CO<sub>2</sub> *incubator* (Thermolyne), *shaker* media (Thermolyne), timbangan *digital* (Metter), *autoclave* (Tomy), vortex (Thermolyne), laminar flow, alat-alat gelas, autoklaf, incubator, spektrofotometer, vortex, refrigerator, pipet mikro dan tip, *ccentrifuge*, alat pH meter, api bunzen.

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Universitas Brawijaya

## 4.6 Prosedur dan pengumpulan data

### 4.6.1. Penelitian Tahun ke-2

#### Persiapan Kultur isolat BAL

Isolat ditumbuhkan pada media MRSB (Oxoid) dalam kondisi fakultatif an aerob dalam jangka waktu 18-20 jam pada suhu 37°C. Setelah ditumbuhkan dalam waktu tersebut, dilakukan pemanenan dengan cara dilakukan sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3500 rpm. Selanjutnya supernatant yang diperoleh dibuang serta pellet dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan 0,1% pepton water. Selanjutnya dilakukan rekonstitusi menggunakan larutan 10% susu skim + 1% MSG steril serta ditambahkan 20% gliserol. Masing-masing cryotubes sesegera mungkin dilakukan pembekuan pada suhu -80°C untuk dapat digunakan selanjutnya. Pada tiap percobaan digunakan kultur stok yang selanjutnya diinokulasikan pada media. Setiap isolate bakteri disubkultur pada media MRSB sebanyak dua kali sebelum dipakai untuk pengujian.

#### Identifikasi gen pengkode 16S DNA

##### Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Ausubel *et al* (1987).

- a. Sebanyak 100 mL suspensi sel yang sudah ditumbuhkan selama 16 jam dipanen dengan sentrifugasi 10 menit, 6000 rpm, 4°C
- b. Supernatan dibuang, sedangkan pellet sel diredispersikan dengan 5 mL buffer TE
- c. Suspensi dibekukan pada -20°C selama 30 menit
- d. Sebanyak 500 µL larutan liozyme 10 mg/mL ditambahkan pada sel beku kemudian dicairkan pada suhu kamar
- e. Setelah cair segera pindahkan ke dalam es 45 menit
- f. Menambahkan Larutan STEP 1 mL ke dalam suspensi sel, dicampur dengan baik
- g. Memanaskan campuran 50°C, 1 jam sambil sesekali digoyang perlahan
- h. Memasukkan 6 ml campuran phenol:kloroform: isoamil alkohol (25:24:1)
- i. Mencampur perlahan selama 5 menit hingga terbentuk emulsi
- j. Melakukan sentrifugasi campuran pada 15.000 rpm, 5 menit

- k. Memindahkan fase air (paling atas) ke tabung baru yang steril
- l. Menambahkan Na-asetat 3M sebanyak ,1x volume total serta campur perlahan
- m. Menambahkan 2x volume etanol absolute dingin, campur perlahan
- n. Inkubasi pada -20°C selama 1 jam
- o. Sentrifugasi campuran 15.000 rpm, 5 menit
- p. Pellet dicuci dengan 0,6 mL etanol 70%
- q. Sentrifugasi 15.000 rpm, 10 menit
- r. Supernatant dibuang, pellet dilarutkan dengan 50 µL distilled water.

### Amplifikasi DNA dengan PCR

PCR menggunakan kit *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) dengan *primer forward* PB36 5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Invitrogen) dan *primer reverse* PB38 5'-GMT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Invitrogen) yang memproduksi ± 1400pb.

*Master mix* reaksi amplifikasi adalah 10X *high fidelity PCR buffer* 2,5µl, 10 mM dNTP mix 2 µl, 50 mM MgSO<sub>4</sub> 1 µl, *primer forward* 1 µl (10 pmol/µl), *primer reverse* 1µl (10 pmol/µl), *template cDNA* 2 µl, *platinum tag high fidelity* 0,2µl, *distilled water* sampai volume total 20µl. Kondisi PCR yaitu *predenaturasi* pada 95°C selama 5 menit, *denaturasi* pada 95°C selama 1 menit, *annealing* pada 50°C 1 menit, *extension* pada 72°C 1 menit, 30 siklus dan *final extension* pada 72°C selama 10 menit.

Hasil PCR dianalisis dengan gel elektroforesis pada gel agarose 2 % yang mengandung *ethidium bromide*. 5 µl DNA ditambahkan 2 µl *loading dye* dimasukkan pada sumuran agarose. Kemudian dijalankan dengan tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya dideteksi dengan UV-transluminator dan difoto dengan kamera polaroid.

### Analisis Sekuensing

Analisis fragmen DNA dari PCR dimurnikan dengan *Gel Band Purification Kit* (GFX kit), dengan diketahui konsentrasi DNA murni. Sekuensing DNA, primer, campuran sekuensing yaitu Tag, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP,



ddTTP). Hasil sekuensing diperiksa dengan elektroforegram berdasarkan urutan DNA (Lab. Bioteknologi PAU–ITB Bandung). Analisis dengan program proses DNA–Star yaitu data dimasukan (*Blast*) ke *gen bank* dari *National Centre Biotech Information* (NCBI), sehingga akan diperoleh berdasarkan *Phylogenetic tree* yaitu berbagai bakteri yang urutan DNA nya mendekati sampel dan prosentase kedekatannya.

### Uji bakteriosin

#### Prosedur Kerja Uji adanya bakteriosin

Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri indikator dengan menggunakan metode sumuran (Sudirman dkk. 1995). Sebelum dilakukan uji aktivitas, supernatan dinetralisasi dengan menggunakan larutan NaOH 1N sehingga pH akhir berkisar antara 6,5–7, selanjutnya difiltrasi dengan menggunakan filter *milliphore* (Sartorius) berukuran 0,2  $\mu\text{m}$ . Uji aktivitas dilakukan terhadap bakteri indikator antara lain *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* WPL 415 dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml, diinokulasikan pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) Agar 1% (Oxoid) pada temperatur  $45^\circ\text{C}$ . Selanjutnya dituangkan pada cawan Petri dibiarkan memadat, setelah memadat dibuat lubang sumuran berdiameter 6 mm dengan menggunakan tabung Durham. Lubang tersebut diisi dengan supernatan sebanyak 50  $\mu\text{l}$ , kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 2 jam dan dilanjutkan inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Medine *et al.*, 2001). Diamati ada atau tidak adanya zona hambatan disekitar lubang sumuran yang menunjukkan ada atau tidak adanya senyawa aktif antibakteri yang terdapat di dalam supernatan yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Uji aktivitas dilakukan replikasi sebanyak tiga kali untuk mengetahui adanya senyawa aktif yang sama dan mempunyai aktivitas terhadap bakteri indikator yang sama. Apabila hasil replikasi ketiganya menunjukkan aktivitas sama, maka supernatan tersebut mengandung zat aktif bakteriosin yang diekskresikan oleh BAL pada media MRS selama pertumbuhannya. Selanjutnya isolat BAL diidentifikasi dan dikarakterisasi.

#### Prosedur Kerja Uji Aktvitas Bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*

Bakteriosin sebanyak 50  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada media Agar (Oxoid) yang telah diinokulasi *Staphylococcus aureus*, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 2 jam, selanjutnya diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Harijani, 1997)

Diamati ada atau tidak adanya zona hambatan di sekitar lubang sumuran pada media Agar (Oxoid) yang menunjukkan ada atau tidak adanya aktivitas bakteriosin terhadap *Staphylococcus aureus*.

#### **Prosedur Kerja Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap *Escherichia coli***

Bakteriosin sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam lubang sumuran pada media Agar yang telah diinokulasi *Escherichia coli*, kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 2 jam, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Diamati ada atau tidak adanya zona hambatan di sekitar sumuran pada media Agar yang menunjukkan ada atau tidak adanya aktivitas bakteriosin terhadap *Escherichia coli*

#### **Analisis Data**

Pada tahun kedua merupakan penelitian eksploratif deskriptif. Pencatatan data dilakukan selama penelitian sesuai dengan prosedur kerja penelitian dan ditampilkan secara deskriptif.

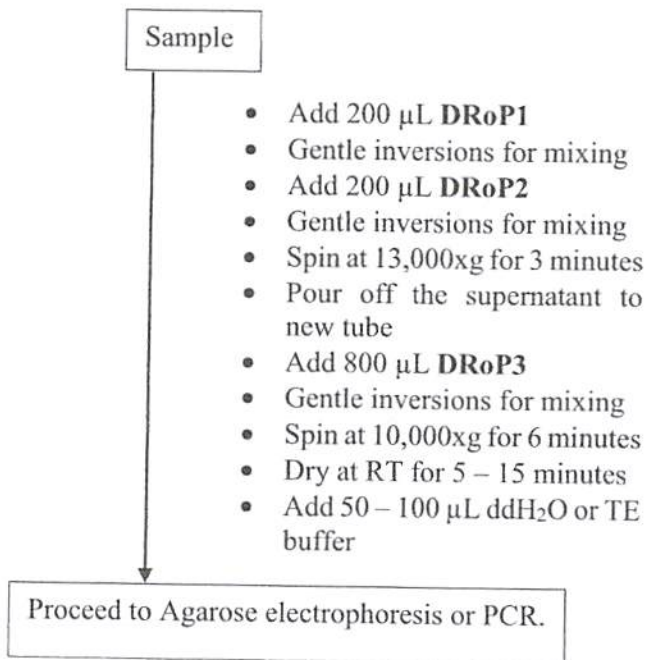
## BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

### Tahapan Ekstraksi DNA/RNA dengan DeRipro Extraction Kit

Sample:

- Jaringan : 0.1g
- Cairan : 0.5 mL - 1 mL
- Whole Blood : 100  $\mu$ L

### DNA/RNA



### Elektroforesis DNA

Bahan kimia

1. Agarose
2. Tris-Borate Acid (TBE): 89 mM Tris-Cl, 89 mM Borate, and 2 mM EDTA solution.

DNA yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Sedangkan pengujian kuantitatif dilakukan dengan menggunakan nanodrop spektrofotometri untuk mengetahui konsentrasi DNA plasmid yang diperoleh.

**Tahapan untuk pengujian secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarose adalah sebagai berikut:**

**1. 1g agarose dimasukkan ke dalam beaker. Tambahkan 100ml TBE 1x untuk membuat suspensi agarose 1%. Suspensi dipanaskan pada suhu 250°C pada lempengan pemanas atau pada microwave jika tersedia. Dalam buffer yang panas, agarose terlarut.**

Agarose menyebabkan penghambatan pendidihan – suspensi mungkin tiba - tiba akan mendidih.

**2. Larutan ini harus sedikit didinginkan dan ditambahkan 1µL EtBr sebelum dituangkan ke dalam tangki elektroforesis, dimana larutan ini akhirnya akan mengeras. Setelah mengeras (kurang lebih 30 menit), memindahkan sisir dan cetakan secara berhati – hati.**

Letakkan agar pada tangki dan Tambahkan TBE 1x ke dalam setiap tangki, sampai gel sepenuhnya terendam. Sisir akan membentuk kantung pada gel, dimana didalamnya dapat diisi dengan sampel.

**3. Mengisikan 2µL DNA plasmid hasil isolasi ke dalam tabung terlabel yang baru dan tambahkan 1µL blue loading buffer untuk fragmen DNA berukuran kecil dan mencampurkan.**

Loading buffer terdiri dari: glycerol. Larutan ini lebih berat daripada buffer TBE 1x, dan sampel akan tenggelam ke dalam lubang pada gel. Ada dua macam blue dyes (bromophenolblue dan xylencyanol) yang mungkin terdapat dalam loading buffer, untuk fragmen berukuran kecil kita tidak menggunakan bromophenolblue karena bahan ini mungkin mengaburkan penampakan dari fragmen yang berukuran kecil. Pewarna tersebut membantu untuk mengontrol memipet sampel. Pewarna ini tidak mewarnai DNA. Ethidium Bromide dan SYBR-Green merupakan pewarna yang mengkelat dalam untai ganda DNA. Bahan

tersebut dapat digunakan untuk memvisualisasikan DNA, karena bahan ini berpendar dibawah sinar UV namun tidak terlihat dalam cahaya biasa.

Membuat catatan di lubang mana DNA dimasukkan, kalau tidak maka sampel tidak dapat diidentifikasi nantinya.

4. Menyalakan power supply (kira- kira 50v – maksimal 100v) untuk memulai elektroforesis.

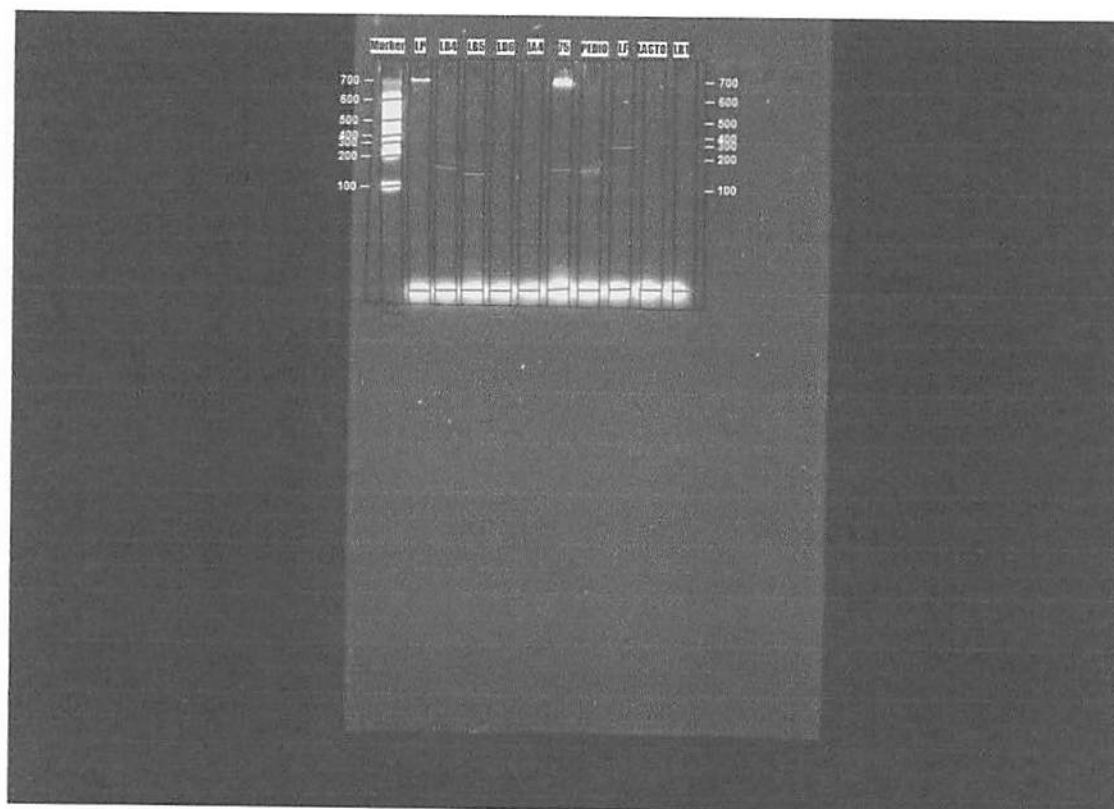
Gel harus dijalankan selama 30-45 menit. Kemudian keluarkan gel dari buffer dan lihat pada UV-box (atau di Dark Reader) untuk melihat pita – pita DNA. Selalu gunakan sarung tangan ketika menangani gel ini.

Fragmen DNA terpisahkan menurut panjangnya. Selama proses ini berlangsung

DNA tersebut tidak tampak.



PCR BAKTERI (LP- -LA4-75- -LF-LACTO-)									
	Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant	Rel. Quant.	Band %	Lane %
Lane 1 (M)	1		700,00000 0	0,08794 8	65961	N/A	1,387280	1,858190	1,814643
	2		600,00000 0	0,16612 4	115943 4	N/A	24,38500 9	32,662468	31,89701 9
	3		500,00000 0	0,25081 4	119583	N/A	2,515048	3,368778	3,289830
	4		400,00000 0	0,31270 4	827955	N/A	17,41340 1	23,324358	22,77774 9
	5		300,00000 0	0,34202 0	313983	N/A	6,603634	8,845229	8,637940
	6		200,00000 0	0,39739 4	422280	N/A	8,881317	11,896069	11,61728 3
	7		100,00000 0	0,52117 3	640548	N/A	13,47189 1	18,044907	17,62202 2
Lane 2 (LP)	1		100,00000 0	0,94805 2	401517	N/A	8,444634	100,00000 0	68,14370 2
Lane 6 (LA4)	1		100,00000 0	0,93871 0	468288	N/A	9,848949	100,00000 0	89,86528 5
Lane 7 (75)	1		151,53788 5	0,44694 5	11232	N/A	0,236229	1,386297	0,767783
	2		100,00000 0	0,93247 6	798984	N/A	16,80408 9	98,613703	54,61592 4
Lane 9 (LF)	1		277,70878 1	0,35256 4	13095	N/A	0,275412	1,866318	1,675360
	2		100,00000 0	0,92628 2	688554	N/A	14,48154 5	98,133682	88,09285 3
Lane 10 (Lacto)	1		100,00000 0	0,92628 2	685233	N/A	14,41169 8	100,00000 0	92,68159 1



Acquisition Information

Imager	Gel Doc™ EZ
Exposure Time	0.262 (Auto - Intense Bands)
Application	GelRed
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time	10
Flat Field	Applied
Serial Number	735BR04835
Software Version	5.2.1
Illumination Mode	UV Transillumination

### Image Information

Acquisition Date 12/10/2017 15:08:36  
User Name user  
Image Area (mm) X: 150.0 Y: 107.8  
Pixel Size (um) X: 107.8 Y: 107.8  
Data Range (Int) 0 - 4095

### Analysis Settings

#### Detection

Lane detection:

Automatically detected lanes with manual adjustments

Band detection:

Automatically detected bands with sensitivity: Low

Manually adjusted bands

Mol. Weight Standard: Bio-Rad 100 bp Molecular Ruler

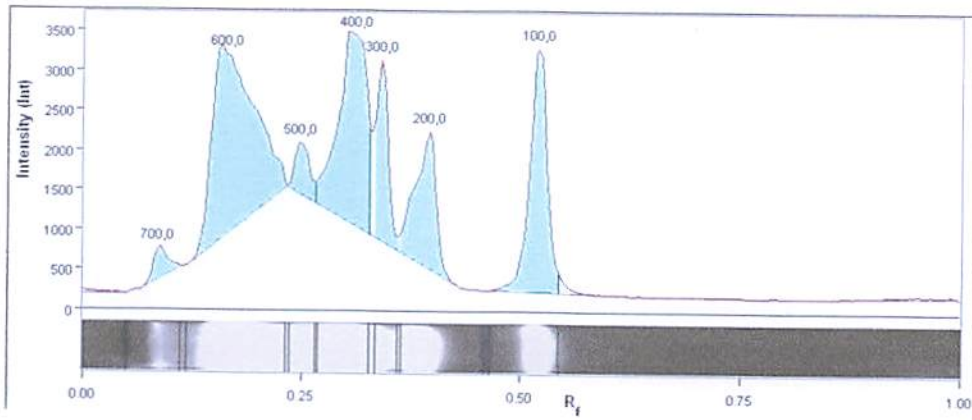
Analysis

Standard lanes: first

Quantity Analysis Reference Band: Lane 8 Band 1

### Lane And Band Analysis

Lane 1 - Bio-Rad 100 bp Molecular Ruler



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1	700,0	700,0	0,088	65.961	N/A	1,39	1,9	1,8
2	600,0	600,0	0,166	1.159.434	N/A	24,39	32,7	31,9
3	500,0	500,0	0,251	119.583	N/A	2,52	3,4	3,3
4	400,0	400,0	0,313	827.955	N/A	17,41	23,3	22,8
5	300,0	300,0	0,342	313.983	N/A	6,60	8,8	8,6
6	200,0	200,0	0,397	422.280	N/A	8,88	11,9	11,6
7	100,0	100,0	0,521	640.548	N/A	13,47	18,0	17,6

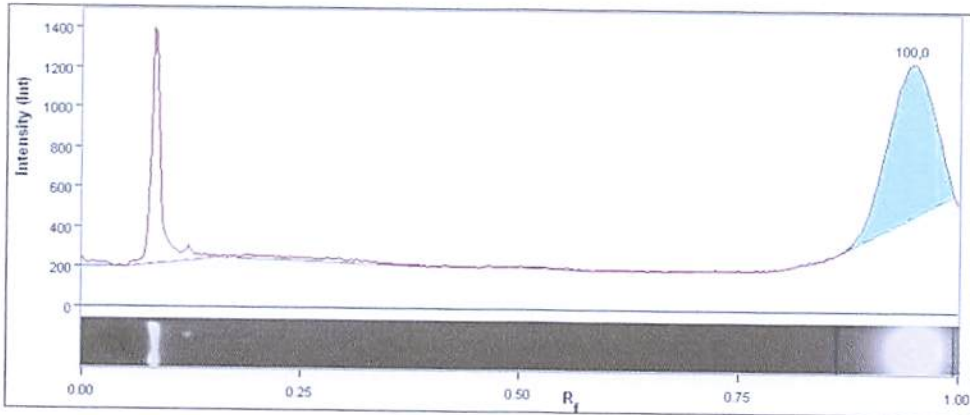
Band Detection Automatically detected bands with sensitivity: Low

Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 2.91 mm

Regression A single equation is not available for this method

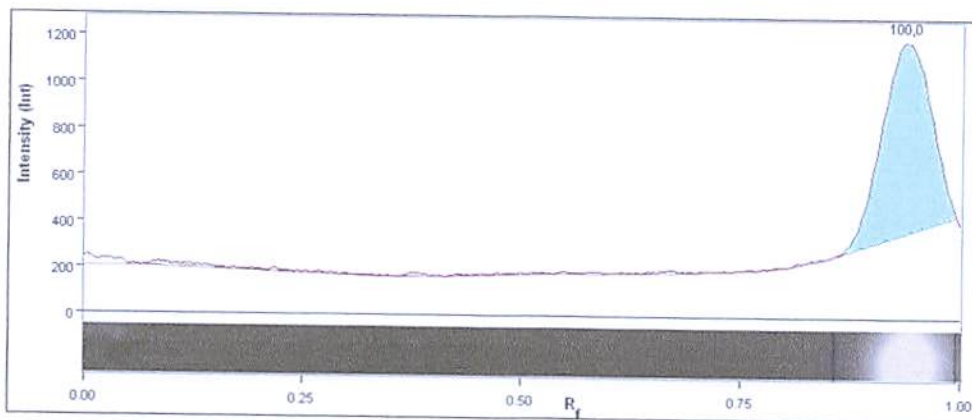
Lane 2



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		100,0	0,948	401.517	N/A	8,44	100,0	68,1

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	2.91 mm
Regression	A single equation is not available for this method

Lane 6





Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		100,0	0,939	468.288	N/A	9,85	100,0	89,9

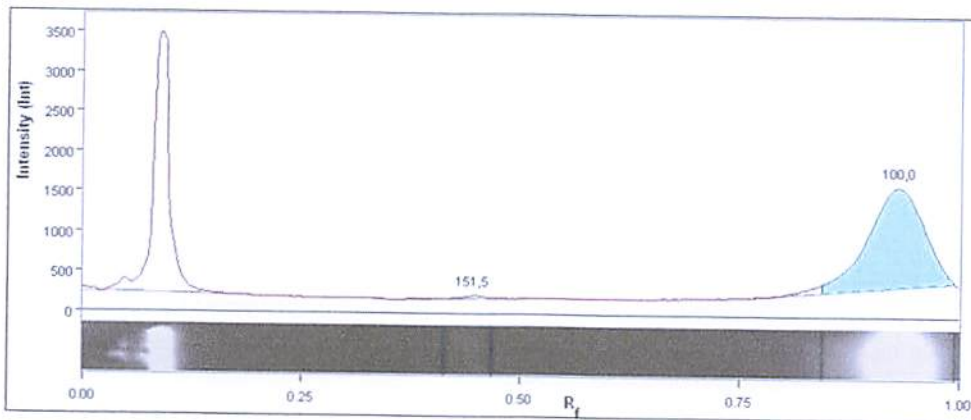
Band Detection Automatically detected bands with sensitivity: Low

Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 2.91 mm

Regression A single equation is not available for this method

Lane 7



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		151,5	0,447	11.232	N/A	0,24	1,4	0,8
2		100,0	0,932	798.984	N/A	16,80	98,6	54,6

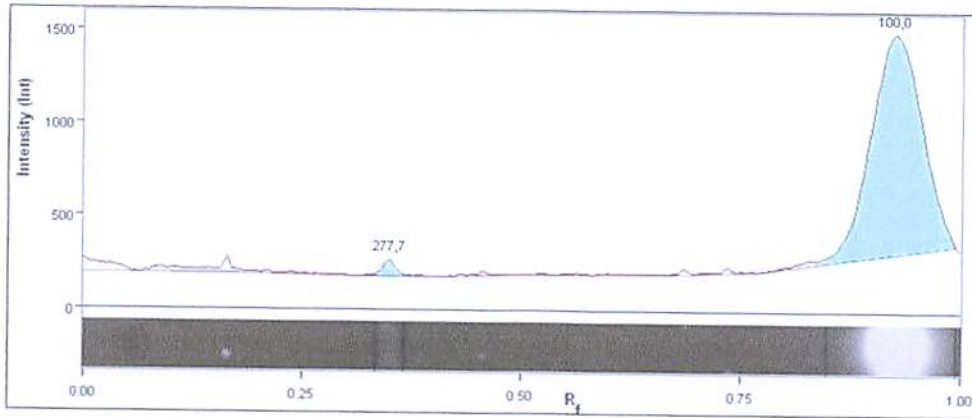
Band Detection Automatically detected bands with sensitivity: Low

Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 2.91 mm

Regression A single equation is not available for this method

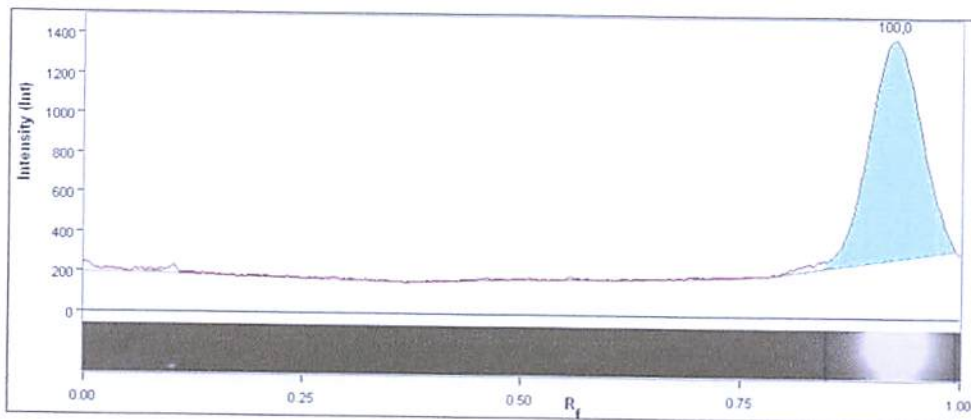
Lane 9



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		277,7	0,353	13.095	N/A	0,28	1,9	1,7
2		100,0	0,926	688.554	N/A	14,48	98,1	88,1

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	2.91 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 10



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		100,0	0,926	685.233	N/A	14,41	100,0	92,7

Band Detection Automatically detected bands with sensitivity: Low

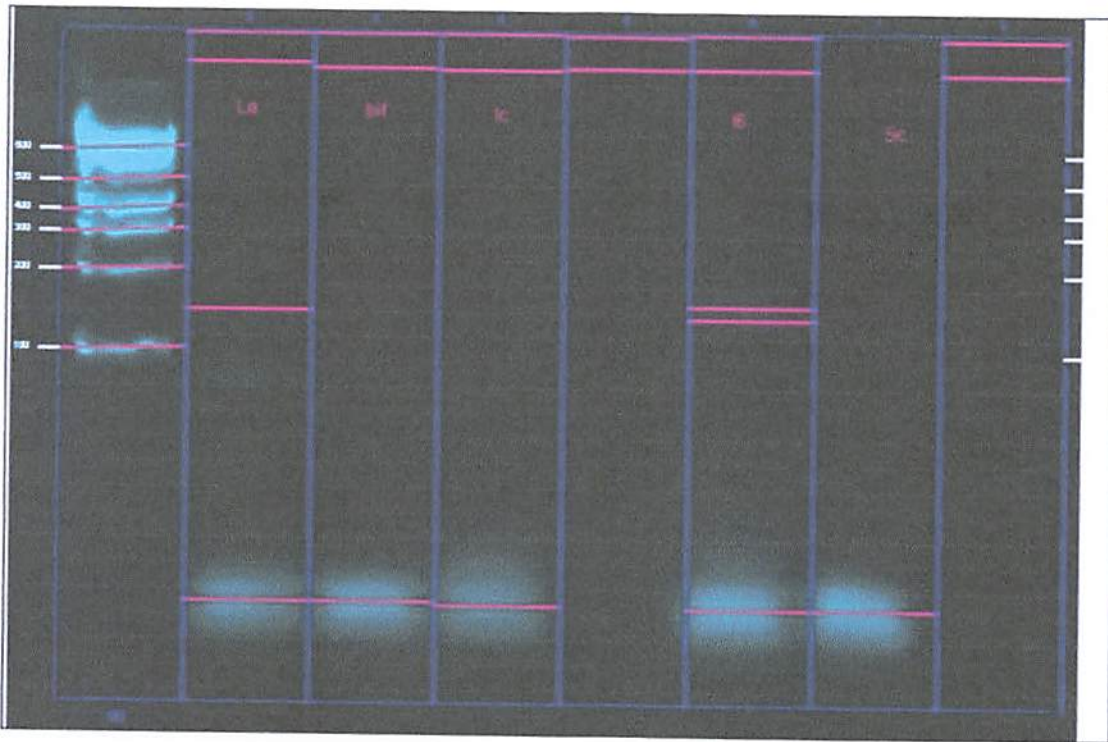
Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 2.91 mm

Regression Equation A single equation is not available for this method

<b>La- Bif- Lc- L6- 5c- kluar-La L6</b>									
	<b>Band No.</b>	<b>Band Label</b>	<b>Base Pairs (bp)</b>	<b>Relative Front</b>	<b>Volume (Int)</b>	<b>Abs. Quant.</b>	<b>Rel. Quant.</b>	<b>Band %</b>	<b>Lane %</b>
<b>Lane 1</b>	1		600,000000	0,178862	4009015	N/A	N/A	59,860909	58,954040
	2		500,000000	0,224932	163442	N/A	N/A	2,440447	2,403475
	3		400,000000	0,268293	966452	N/A	N/A	14,430651	14,212032
	4		300,000000	0,300813	562533	N/A	N/A	8,399504	8,272255
	5		200,000000	0,357724	424651	N/A	N/A	6,340708	6,244649
	6		100,000000	0,476965	571124	N/A	N/A	8,527781	8,398588
<b>Lane 2 La</b>	1		600,000000	0,005420	27193	N/A	N/A	1,696642	1,474722
	2		600,000000	0,048780	14271	N/A	N/A	0,890405	0,773940
	3		141,421344	0,417344	18602	N/A	N/A	1,160627	1,008818
	4		100,000000	0,850949	1542688	N/A	N/A	96,252326	83,662547
<b>Lane 3 Bif</b>	1		600,000000	0,005420	22294	N/A	N/A	1,304583	1,231952
	2		600,000000	0,056911	11218	N/A	N/A	0,656446	0,619900
	3		100,000000	0,850949	1675387	N/A	N/A	98,038971	92,580822
<b>Lane 4 Lc</b>	1		600,000000	0,005420	28755	N/A	N/A	1,790213	1,691376
	2		600,000000	0,059621	14413	N/A	N/A	0,897317	0,847776
	3		100,000000	0,856369	1563065	N/A	N/A	97,312470	91,939862
<b>Lane 5</b>	1		600,000000	0,008130	32163	N/A	N/A	69,585253	10,186643
	2		600,000000	0,056911	14058	N/A	N/A	30,414747	4,452440
<b>Lane 6 L6</b>	1		600,000000	0,005420	27122	N/A	N/A	1,057557	1,005660
	2		600,000000	0,056911	10863	N/A	N/A	0,423576	0,402791
	3		148,265390	0,409214	177571	N/A	N/A	6,923950	6,584178
	4		132,784888	0,428184	101388	N/A	N/A	3,953379	3,759379
	5		100,000000	0,859079	2247647	N/A	N/A	87,641538	83,340792
<b>Lane 7 5c</b>	1		100,000000	0,859079	1922893	N/A	N/A	100,000000	92,499744
<b>Lane 8</b>	1		600,000000	0,010840	35784	N/A	N/A	71,287129	26,086957

	2	600,000000	0,062331	14413	N/A	N/A	28,712871	10,507246
--	---	------------	----------	-------	-----	-----	-----------	-----------



Acquisition Information

Imager	Gel Doc™ EZ
Exposure Time	0.150 (Auto - Intense Bands)
Application	GelRed
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time	10
Flat Field	Applied
Serial Number	735BR04835
Software Version	5.2.1
Illumination Mode	UV Transillumination

Image Information

Acquisition Date	10/10/2017 14:30:49
User Name	user



Image Area (mm) X: 63.4 Y: 43.0  
 Pixel Size (um) X: 107.8 Y: 107.8  
 Data Range (Int) 61 - 4095

Analysis Settings

Detection Lane  
 detection:  
 Manually  
 created lanes

Band detection:

Automatically detected bands with custom sensitivity: 50

Manually adjusted bands

Lane Background Subtraction:

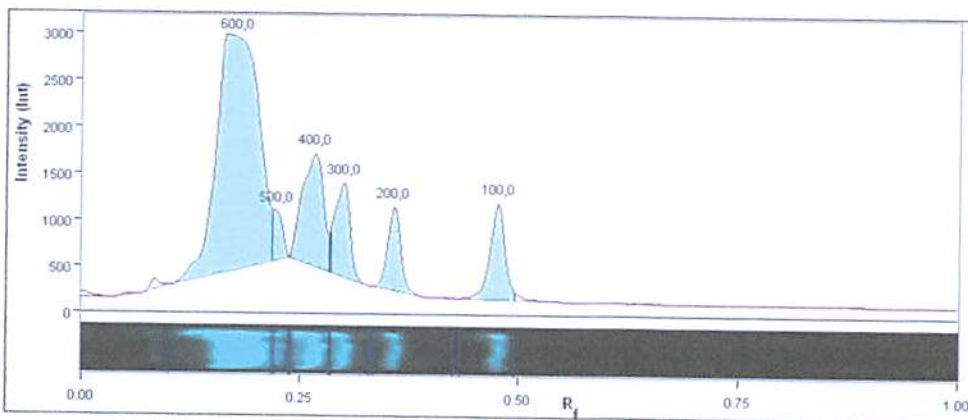
Lane background subtracted with disk size: 10

Mol. Weight Standard: Bio-Rad 100 bp Molecular Ruler

Analysis Standard lanes: first

Lane And Band Analysis

Lane 1 - Bio-Rad 100 bp Molecular Ruler



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,179	4.009.015	N/A	N/A	59,9	59,0
2		500,0	0,225	163.442	N/A	N/A	2,4	2,4
3		400,0	0,268	966.452	N/A	N/A	14,4	14,2
4		300,0	0,301	562.533	N/A	N/A	8,4	8,3
5		200,0	0,358	424.651	N/A	N/A	6,3	6,2
6		100,0	0,477	571.124	N/A	N/A	8,5	8,4

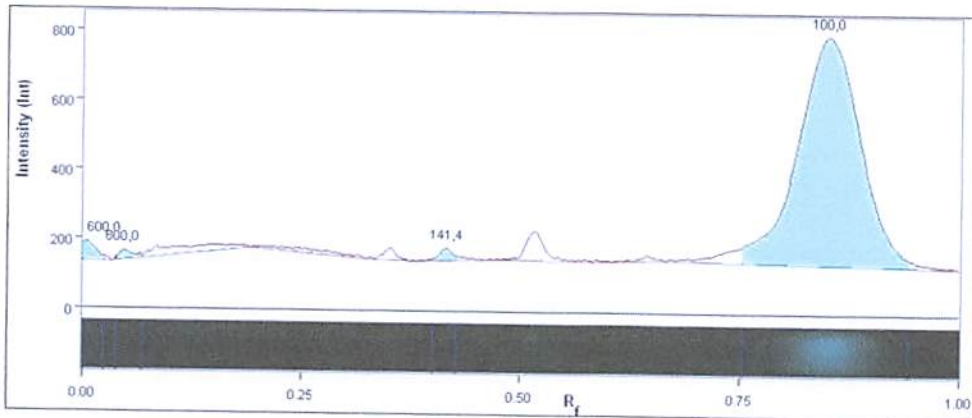
Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50

Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 7.65 mm

Regression Equation A single equation is not available for this method

Lane 2

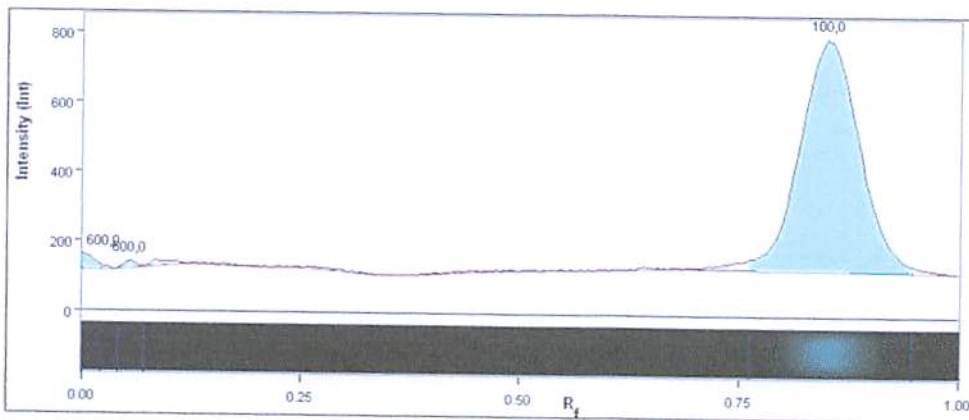


Band No.	Band Label	Base Pairs	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,005	27.193	N/A	N/A	1,7	1,5

2	600,0	0,049	14.271	N/A	N/A	0,9	0,8
3	141,4	0,417	18.602	N/A	N/A	1,2	1,0
4	100,0	0,851	1.542.688	N/A	N/A	96,3	83,7

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50  
 Lane Lane background subtracted with disk size: 10  
 Lane Width 7.65 mm  
 Regression A single equation is not available for this method

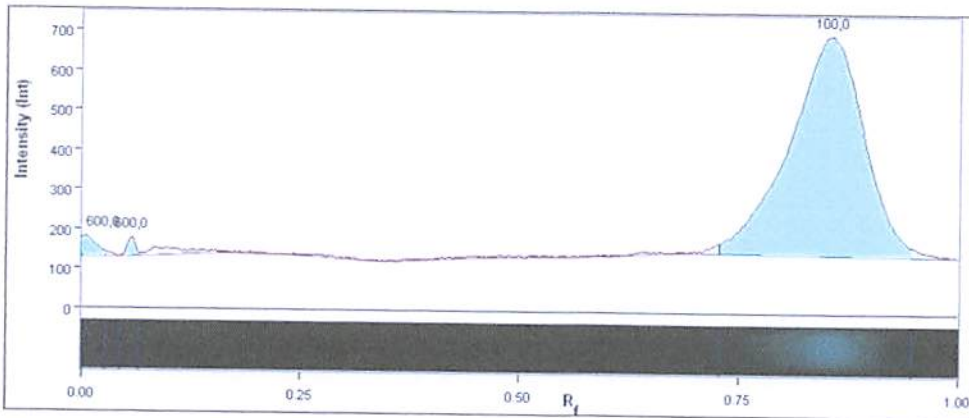
Lane 3



Band No.	Band Label	Base Pairs	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1	600,0	0,005	22.294	N/A	N/A	1,3	1,2	
2	600,0	0,057	11.218	N/A	N/A	0,7	0,6	
3	100,0	0,851	1.675.387	N/A	N/A	98,0	92,6	

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50  
 Lane Lane background subtracted with disk size: 10  
 Lane Width 7.65 mm  
 Regression A single equation is not available for this method

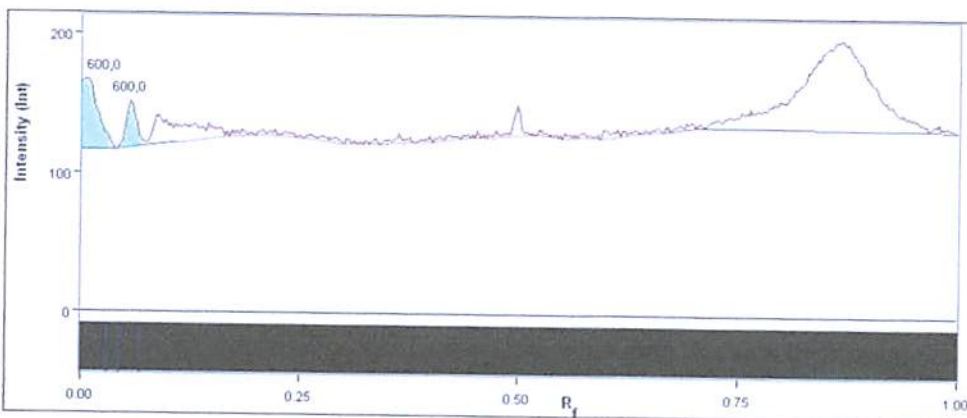
Lane 4



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,005	28.755	N/A	N/A	1,8	1,7
2		600,0	0,060	14.413	N/A	N/A	0,9	0,8
3		100,0	0,856	1.563.065	N/A	N/A	97,3	91,9

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50  
 Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10  
 Lane Width 7.65 mm  
 Regression A single equation is not available for this method

Lane 5



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,008	32.163	N/A	N/A	69,6	10,2
2		600,0	0,057	14.058	N/A	N/A	30,4	4,5

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50

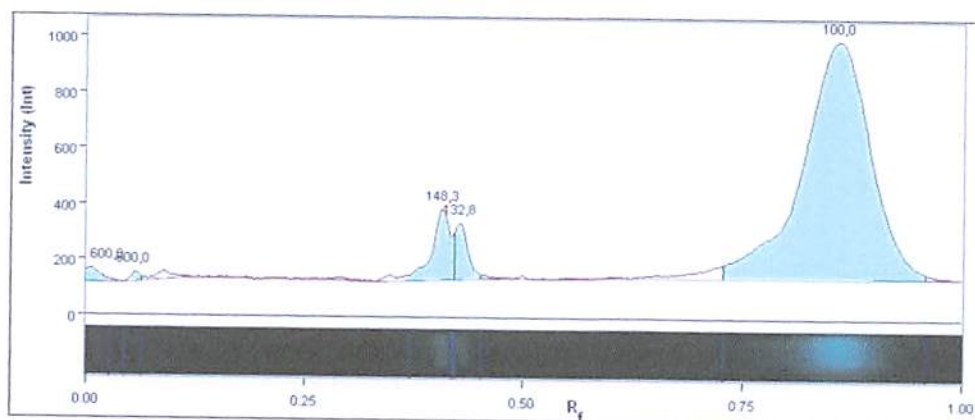
Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 7.65 mm

Regression A single equation is not available for this method

Equation

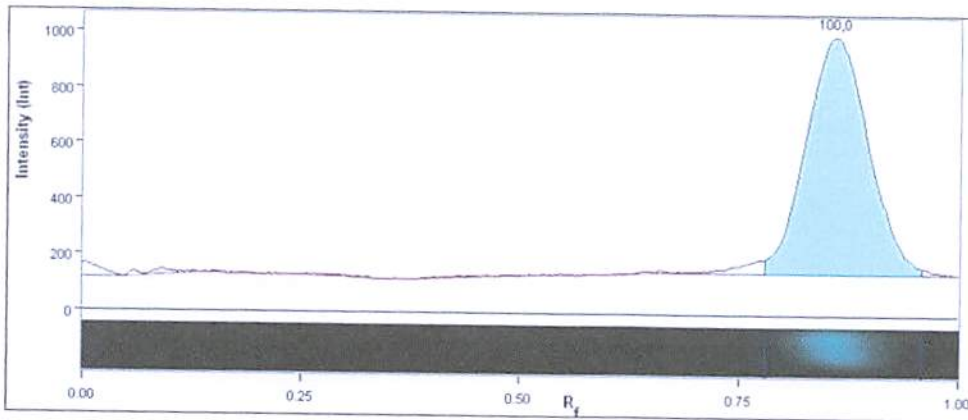
Lane 6



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,005	27.122	N/A	N/A	1,1	1,0
2		600,0	0,057	10.863	N/A	N/A	0,4	0,4
3		148,3	0,409	177.571	N/A	N/A	6,9	6,6
4		132,8	0,428	101.388	N/A	N/A	4,0	3,8
5		100,0	0,859	2.247.647	N/A	N/A	87,6	83,3

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50  
 Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10  
 Lane Width 7.65 mm  
 Regression A single equation is not available for this method  
 Equation

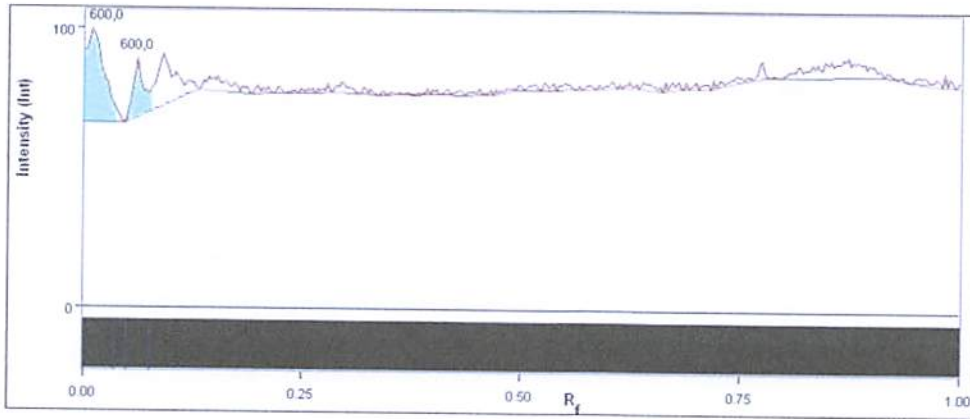
Lane 7



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		100,0	0,859	1.922.893	N/A	N/A	100,0	92,5

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50  
 Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10  
 Lane Width 7.65 mm  
 Regression A single equation is not available for this method

Lane 8



Band No.	Band Label	Base Pairs (bp)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		600,0	0,011	35.784	N/A	N/A	71,3	26,1
2		600,0	0,062	14.413	N/A	N/A	28,7	10,5

Band Detection Automatically detected bands with custom sensitivity: 50

Lane Background Lane background subtracted with disk size: 10

Lane Width 7.65 mm

Regression A single equation is not available for this method



### 1. *Lactobacillus plantarum* WPL 117

Tabel 1. Hasil uji survival terhadap pH pada isolat *Lactobacillus plantarum* WPL 117

Survival of lactic bacteria	Biomassa (berat sel kering) (mg/100 mL)			
	MRS Agar Kontrol	MRS Agar pH 2	MRS Agar pH 4	MRS Agar Oxbile salt
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50.2	50.1	49.9	22.6

Tabel 2. Hasil uji Antibacterial activity

Isolat	Antibacterial activity/Diameter zona hambat (Bacteriosin)			
	Crude bacteriosin (mm)		Extract bacteriosin (mm)	
	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	20	9	0	0

Berdasarkan hasil biomassa (berat sel kering) (mg/100 mL), isolat WPL 117 pada media MRS broth control menghasilkan biomassa sebesar 50.2 mg/100 mL. Selanjutnya bila dibandingkan dengan perlakuan yaitu pada pengujian ketahanan terhadap keasaman (pH), hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 menghasilkan biomassa sebesar 50.1 mg/100 mL pada pH 2 dan 49.9 mg/100 mL pada pH 4. Isolat WPL 117 menunjukkan kemampuannya terhadap oxbile salt dengan diameter 22.6 mm

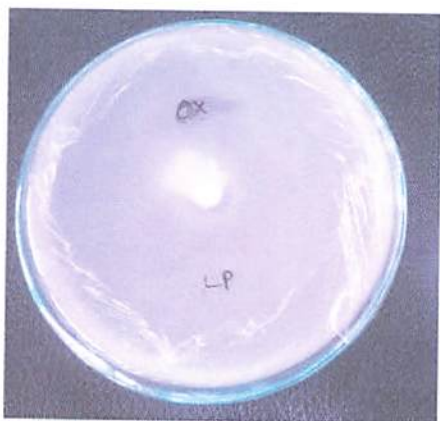
Berdasarkan hasil uji ketahanan terhadap garam empedu, isolat WPL 117 pada media MRS broth kontrol menghasilkan biomassa sebesar 50.2 mg/100 mL, sedangkan pada media MRS broth *Oxbile salt* hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 menghasilkan biomassa sebesar 22.6 mg/100 mL.

Tabel 3. Pengukuran Pertumbuhan Diameter Zona Hambat (mm) *Lactobacillus plantarum* WPL 117 terhadap pH dan *Oxbile Salt*

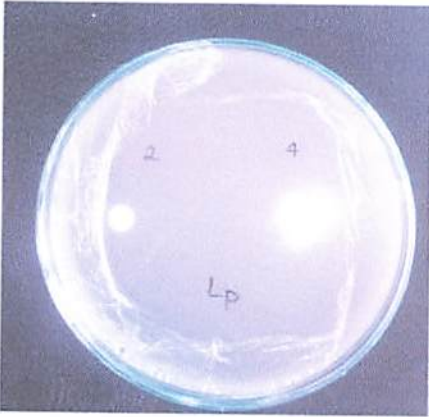
	Diameter Zona Hambat		
	pH 2	pH 4	<i>Oxbile Salt</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> WPL 117	0	0	11.5

Berdasarkan hasil pengukuran pertumbuhan diameter zona hambat (mm) terhadap keasaman dan garam empedu, maka hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat WPL 117 pada pH 2 menunjukkan hasil sebesar 0 mm, pH 4 sebesar 0 mm serta terhadap *Oxbile Salt* sebesar 11.5 mm.

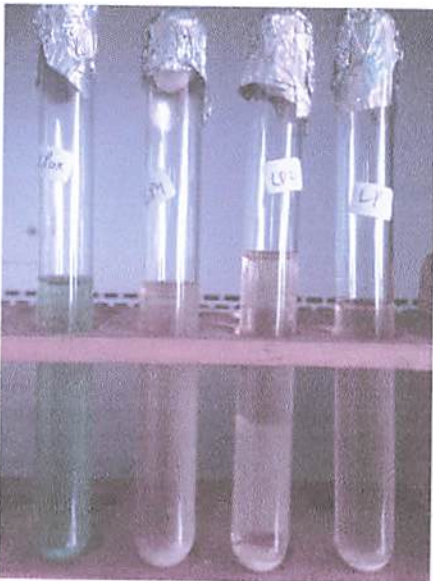
Hasil penelitian Huang et al, (2015) pada uji antagonisme dengan supernatan *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 menunjukkan halo maksimum 28 mm terhadap *Listeria monocytogenes*. Urutan penghambatannya adalah sebagai berikut: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter sakazakii*, dan *Staphylococcus aureus*. *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 sensitif terhadap beberapa antibiotik (misalnya macrolide, sulfonamides, aminoglikosida, tetrasiklin dan  $\beta$ -laktam), sedangkan resisten terhadap antibiotik glikopeptida, kuinolon, dan sefalosporin. *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 menunjukkan daya tahan tinggi terhadap pH rendah, garam empedu, dan cairan gastrointestinal, dan memiliki sifat modulasi mikrobiota dan antibakteri usus besar dengan aplikasi potensial dalam pengembangan makanan olahan susu dan nutraceuticals.



Gambar 1. Uji isolat *Lactobacillus plantarum* WPL 117 terhadap *oxbile salt*



Gambar 2. Uji isolat *Lactobacillus plantarum* WPL 117 terhadap pH



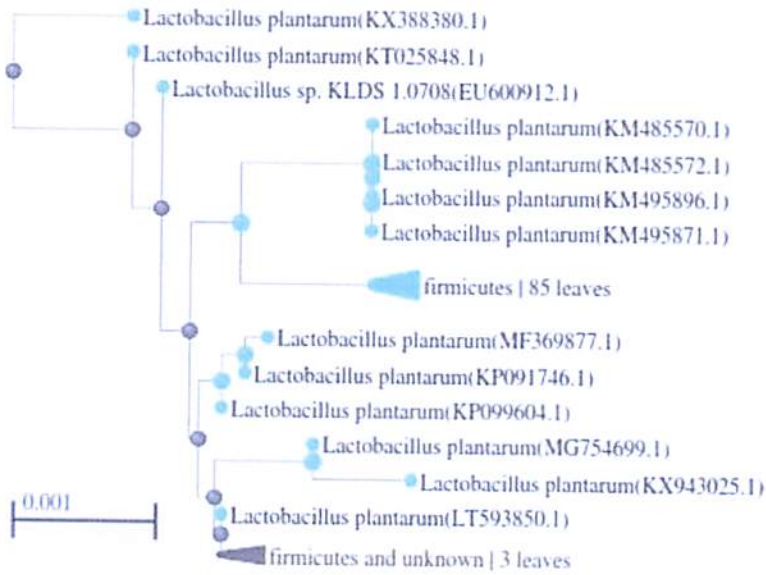
Gambar 3. Uji ketahanan *Lactobacillus plantarum* WPL 117 terhadap keasaman pada pH 2, pH 4 dan Oxbile salt

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* WLPL04 mampu bertahan pada pH 2,5 selama 3 jam dan pada garam empedu 0,45% selama 12 jam, menunjukkan bahwa ia dapat bertahan dengan baik di saluran cerna. Selain itu, hasil exopolysaccharide dari *Lb. plantarum* WLPL04 mencapai  $426,73 \pm 65,56$  mg / L pada 24 jam. Dengan strategi persaingan, hambatan, dan perpindahan, *Lb. plantarum* WLPL04 mengurangi adhesi *E. coli* O157: H7 (35,51%), *Sal. typhimurium* ATCC 13311 (8,10%), dan *Staph. aureus* CMCC 26003 (40,30%) pada sel Caco-2

berdasarkan kompetisi, dan selanjutnya masing-masing 59,80, 62,50, dan 42,60% untuk 3 patogen melalui penghambatan, dan masing-masing 75,23, 39,97, dan 52,88% melalui perpindahan. *Lactobacillus plantarum* WLPL04 mengurangi tekanan akut yang disebabkan oleh sodium dodecyl sulfate pada sel Caco-2 dan secara signifikan menghambat ekspresi sitokin inflamasi (IL-6, IL-8 dan tumor necrosis factor- $\alpha$ ) pada sel Caco-2 namun meningkatkan IL-10 Ekspresi in vitro dibandingkan dengan kelompok yang diberi Salmonella, sehingga *Lb. plantarum* WLPL04 dari ASI dapat dianggap sebagai kandidat probiotik untuk produk susu untuk mempromosikan kesehatan manusia (Jiang et al, 2016).

>Ist\_BASE\_3021408\_LB5\_WF

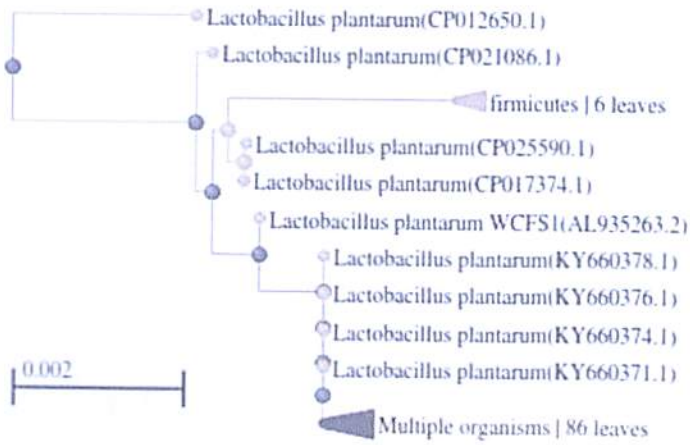
```
AGGCAGTGGCGGGGTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACTCTAGGTATTGATTGAGTG
CTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAAC
CTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTG
GACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGG
CGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTG
AGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTG
TTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGGGTAGCGGTGAAGAAGGC
GGCC
```



>1st\_BASE\_3021418\_LB5\_WR

```

CGGTCCTTTTTGCCTCAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTT
TCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGACAAC
GCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTT
AAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTT
TTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATT
GTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATG
TGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCAC
CATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTC AAG
CTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCC
CCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTA
AATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCA
CGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGTCCAAACTCTAAAAACGCCCT
    
```



## 2. *Lactobacillus casei* WPL315

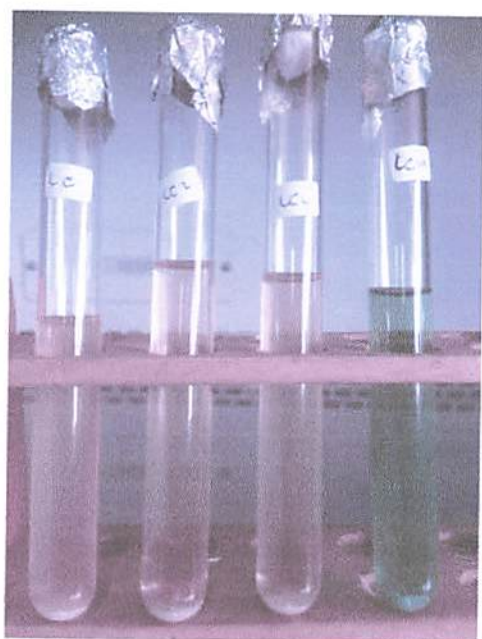
Tabel 4. Antibacterial activity *Lactobacillus casei* WPL315

Isolat	Antibacterial activity/Diameter zona hambat (Bacteriosin)			
	Crude bacteriosin (mm)		Extract bacteriosin (mm)	
	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	22	9.5	6.5	4



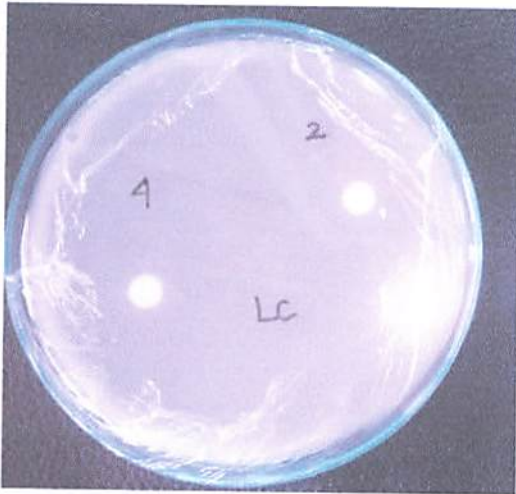


Gambar 4. Isolat *Lactobacillus casei* WPL315 dalam media MRSA agar miring

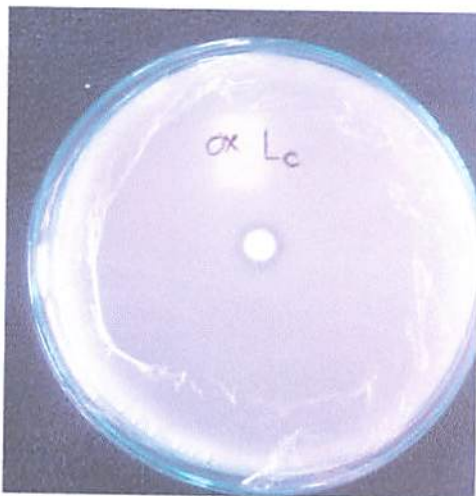


Gambar 5. Uji isolat *Lactobacillus casei* WPL 617 terhadap pH dan *Oxibile Salt*





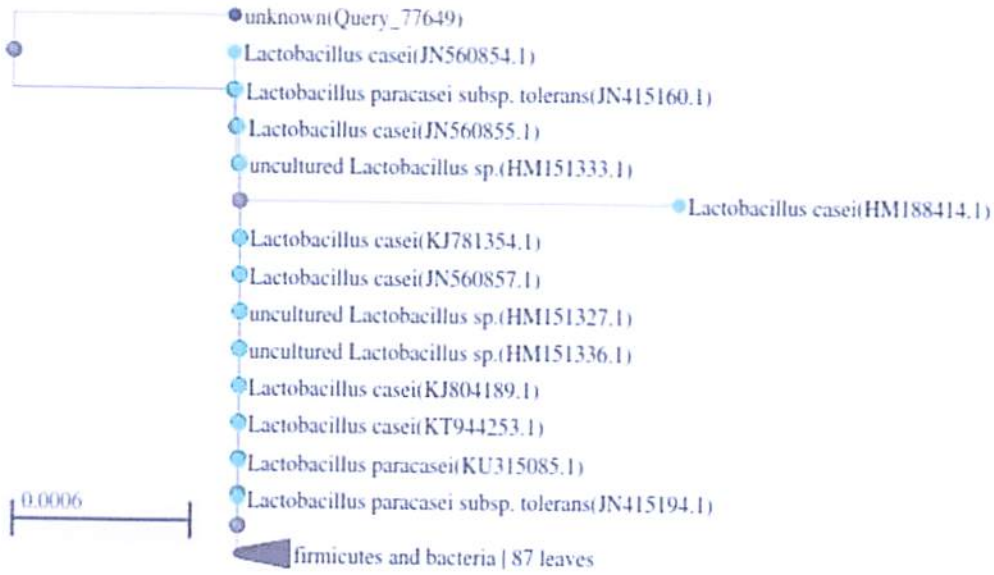
Gambar 6. Uji isolat *Lactobacillus casei* WPL 617 terhadap pH 2 dan 4



Gambar 7. Uji isolat *Lactobacillus casei* WPL 617 terhadap Oxbile Salt

>1st\_BASE\_3021409\_LCC5\_WF

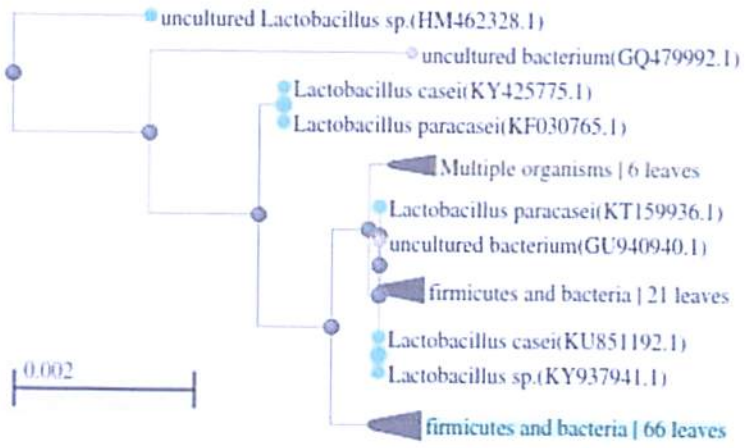
```
TGGGAGGGGCGGGCGTGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCAAGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGG
AACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAAACAGATGCTAATAC
CGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCCTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCGATGATACGTAGCCGAAGTGGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGT
ATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGG
GAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAGAGGGGG
```



>1st\_BASE\_3021419\_LCC5\_WR

```

CGGGTTCATCTGCTCAGTTTCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTAAGCCGAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACC
GCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCACGCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAGTTTTACG
ACCCGAAAGCCTTCTTCACTCAGCGCGGCTTGCTCCATCAGACTTGGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCC
CGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAG
CCATTACCTCACCAACTAGCTAATACGCCGCGGTTCCATCCAAAAGCGATAGCTTACGCCATCTTTCAGCCAAGAACCAT
GCGGTTCTTGGATCTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCACTTAAGGGCAGGTTACCCACGTGTTAC
TCACCCGTCGCCACTCGTTCCATGTTGAATCTCGGTGCAAGCACCGATCATCAACGAGAACCTCGTTCGACTTGCATGTA
TTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATAATCAAACCTCTAATAACCCCCCCCCC
    
```



Alignment: F:\dok yudit\hasil blast\75-Lcc5.fas

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
MF629001.1 -GGGAAGGGC GG-CGTGCTA TACATGCA-G TCGAACGAGT TCTCGTTGAT
3021409_LC TGGGAGGGGC GGGCGTGCTA TACATGCA-G TCGAACGAGT TCTCGTTGAT
3021411_75 TGGGCCGGGC GG-CGTGCTA TACATGCAAG TCGAACGAGT TCTCGTTGAT
JN560859.1 -----TGGGC GG-CGTGCTA TACATGCAAG TCGAACGAGT TCTCGTTGAT

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90     100
MF629001.1 GATCG--GTG CTTGCACCGA GATTCAACAT GGAACGAGTG GCGGACGGGT
3021409_LC GATCA-AGTG CTTGCACCGA GATTCAACAT GGAACGAGTG GCGGACGGGT
3021411_75 GATCAGAGTG CTTGCACCGA GATTCAACAT GGAACGAGTG GCGGACGGGT
JN560859.1 GATCG--GTG CTTGCACCGA GATTCAACAT GGAACGAGTG GCGGACGGGT

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110     120     130     140     150
MF629001.1 GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCTTAAGT GGGGGATAAC ATTTGGAAC
3021409_LC GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCTTAAGT GGGGGATAAC ATTTGGAAC
3021411_75 GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCTTAAGT GGGGGATAAC ATTTGGAAC
JN560859.1 GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCTTAAGT GGGGGATAAC ATTTGGAAC

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160     170     180     190     200
MF629001.1 AGATGCTAAT ACCGCATAGA TCCAAGAACC GCATGGTTCT TGGCTGAAAG
3021409_LC AGATGCTAAT ACCGCATAGA TCCAAGAACC GCATGGTTCT TGGCTGAAAG
3021411_75 AGATGCTAAT ACCGCATAGA TCCAAGAACC GCATGGTTCT TGGCTGAAAG
JN560859.1 AGATGCTAAT ACCGCATAGA TCCAAGAACC GCATGGTTCT TGGCTGAAAG

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210     220     230     240     250
MF629001.1 ATGGCGTAAG CTATCGCTTT TGGATGGACC CGCGGCGTAT TAGCTAGTTG
3021409_LC ATGGCGTAAG CTATCGCTTT TGGATGGACC CGCGGCGTAT TAGCTAGTTG
3021411_75 ATGGCGTAAG CTATCGCTTT TGGATGGACC CGCGGCGTAT TAGCTAGTTG
JN560859.1 ATGGCGTAAG CTATCGCTTT TGGATGGACC CGCGGCGTAT TAGCTAGTTG

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260     270     280     290     300
MF629001.1 GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAA CTGAGAGGTT
3021409_LC GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAA CTGAGAGGTT
3021411_75 GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAA CTGAGAGGTT
JN560859.1 GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAA CTGAGAGGTT

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310     320     330     340     350
MF629001.1 GATCGGCCAC ATTTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG
3021409_LC GATCGGCCAC ATTTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG

```

**3021411\_75** GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG  
**JN560859.1** GATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 360 370 380 390 400

**MF629001.1** CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGCAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG  
**3021409\_LC** CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGCAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG  
**3021411\_75** CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGCAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG  
**JN560859.1** CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGCAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 410 420 430 440 450

**MF629001.1** TGAGTGAAGA AGGCTTTCGG GTCGTAAAAC TCTGTTGTTG GAGAAGAATG  
**3021409\_LC** TGAGTGAAGA AGGCTTTCGG GTCGTAAAAC TCTGTTGTTG GAGAAGAATG  
**3021411\_75** TGAGTGAAGA AGGCTTTCGG GTCGTAAAAC TCTGTTGTTG GAGAAGAATG  
**JN560859.1** TGAGTGAAGA AGGCTTTCGG GTCGTAAAAC TCTGTTGTTG GAGAAGAATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 460 470 480 490 500

**MF629001.1** GTCGGCAGAG TAACTGTTGT CCGCGTGACG GTATCCAACC AGAAAGCCAC  
**3021409\_LC** GTCGGCAGAG TAACTGTTGT CCGCGTGACG GTATCCAACC AGAAAGCCAC  
**3021411\_75** GTCGGCAGAG TAACTGTTGT CCGCGTGACG GTATCCAACC AGAAAGCCAC  
**JN560859.1** GTCGGCAGAG TAACTGTTGT CCGCGTGACG GTATCCAACC AGAAAGCCAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 510 520 530 540 550

**MF629001.1** GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT  
**3021409\_LC** GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT  
**3021411\_75** GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT  
**JN560859.1** GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 560 570 580 590 600

**MF629001.1** CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT AAGTCTGATG  
**3021409\_LC** CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT AAGTCTGATG  
**3021411\_75** CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT AAGTCTGATG  
**JN560859.1** CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT AAGTCTGATG

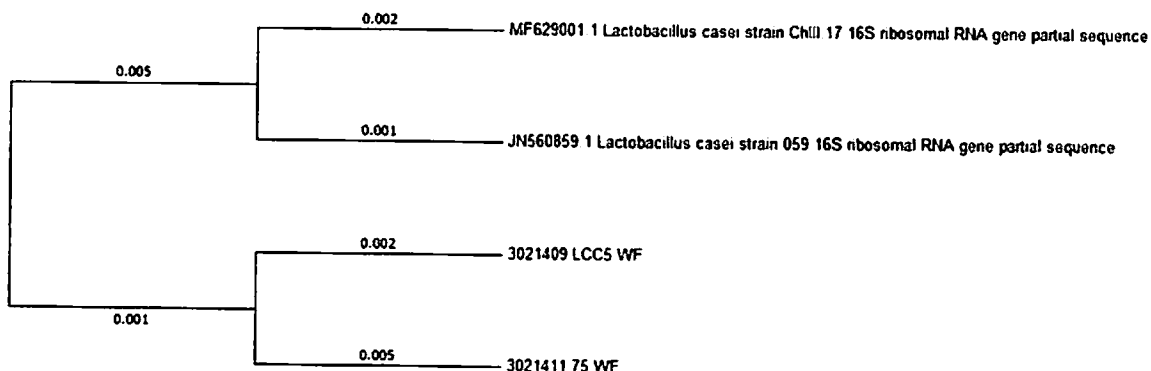
.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 610 620 630 640 650

**MF629001.1** TGAAAGCCCT CGGCTTAACC GAGGAAGCGC ATCGGAAACT GGGAAACTTG  
**3021409\_LC** TGAAAGCCCT CGGCTTAACC GAGGAAGCGC ATCGGAAACT GGGAAACTTG  
**3021411\_75** TGAAAGCCCT CGGCTTAACC GAGGAAGCGC ATCGGAAACT GGGAAACTTG  
**JN560859.1** TGAAAGCCCT CGGCTTAACC GAGGAAGCGC ATCGGAAACT GGGAAACTTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 660 670 680 690 700

**MF629001.1** AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA  
**3021409\_LC** AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA GAGGGG---

3021411\_75 AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGG GTAGCGGTGA GAGGGTTG--  
 JN560859.1 AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA



3. *Lactobacillus acidophilus* WPL 517 (La)

Tabel 5. Antibacterial activity *Lactobacillus acidophilus* WPL 517 (La)

Antibacterial activity/Diameter zona hambat (Bacteriosin)				
Isolat	Crude bacteriosin (mm)		Extract bacteriosin (mm)	
	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	18.5	8	6.5	4

4. *Lactobacillus fermentum*

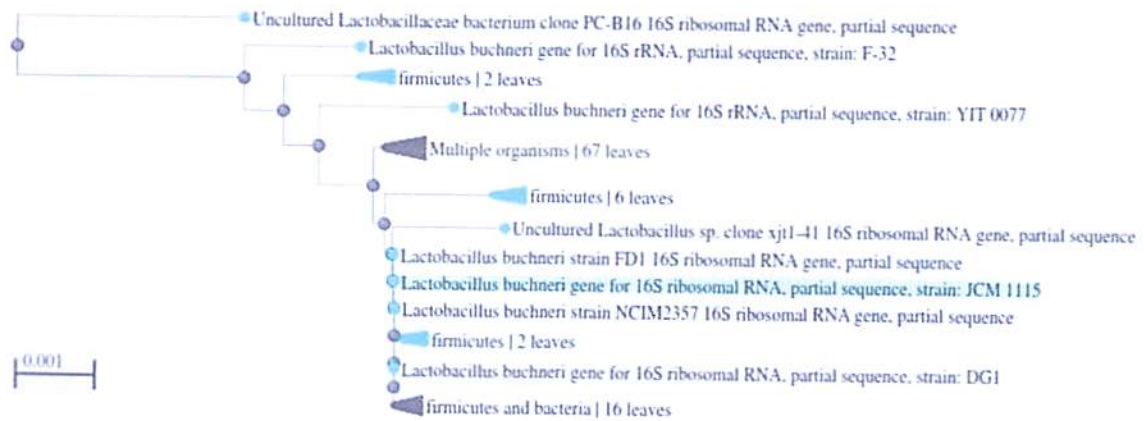
Tabel 6. Antibacterial activity *Lactobacillus fermentum*

Antibacterial activity/Diameter zona hambat (Bacteriosin)				
Isolat	Crude bacteriosin (mm)		Extract bacteriosin (mm)	
	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	0	0	0



>1st\_BASE\_3021410\_LF\_WF

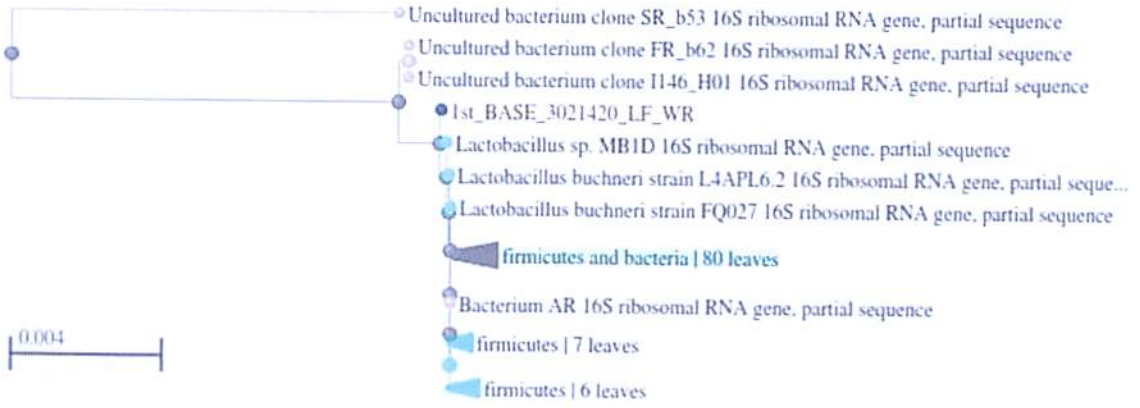
GTGCAATGGGGCGTGTCTATACATGCAAGTCGAACGCGTCTCCGTTAATGATTTTAGGTGCTTGCACCTGAAAGATTTAA  
 CATTGAGACGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTG  
 CTAATACCGTATAACAACCAAAACCACCTGGTTTTGGTTTAAAAGACGGCTTCGGCTGTCACCTTTAGGATGGACCCGCGG  
 CGTATTAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG  
 GACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG  
 CCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCAGAGTAACTGTTGACATCT  
 TGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA  
 TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGG  
 AAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAGAGTGGT



>1st\_BASE\_3021420\_LF\_WR

CGGTTCCCTTGCTCAGTCTCCGGTTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACCTAAAAACCG  
 CCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGGGCTGCTGGCAGGTAGTTAGC  
 CGTGGCTTTCTGGTTGGATACCGTCAAGATGTCAACAGTTACTCTGACACCTGTTCTTCCAACAACAGAGTTTTACGA  
 GCCGAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC  
 GTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATCGCCTTGGTAAGC  
 CGTTACCTTACCAACAAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCTAAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTTTAAACCAAAACCAGG  
 TGGTTTTGGTTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCTACTTCAAGGGCAGGTTACCCAGTGTTAC  
 TCACCAGTTCGCCACTCGTCTCAATGTTAAATCTTTCAAGTGCAAGCACCTAAAATCATTAAACGGAGACGCGTTCGACTT  
 GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCATGATCAAAACTCTAACGGCCCCCCCC





Alignment: F:\dok yudit\hasil blast\LF-KF.fas

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
KF418820.1 -----GGGT TACGGCGTGC T--ATACATG CAAGTCGAAC GCGTCTCCGT
3021410_LF ---GTGCAAT GGGGGCGTGC T--ATACATG CAAGTCGAAC GCGTCTCCGT
KX499351.1 GACGAACGCT GCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAAC GCGTCTCCGT
KT363770.1 -----TC AGGGGGGAGC T--ATACATG CAAGTCGAAC GCGTCTCCGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90     100
KF418820.1 TAATGATTTT AGGTGCTTGC ACTTGAAAGA TTTAACATTG AGACGAGTGG
3021410_LF TAATGATTTT AGGTGCTTGC ACTTGAAAGA TTTAACATTG AGACGAGTGG
KX499351.1 TAATGATTTT AGGTGCTTGC ACTTGAAAGA TTTAACATTG AGACGAGTGG
KT363770.1 TAATGATTTT AGGTGCTTGC ACTTGAAAGA TTTAACATTG AGACGAGTGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110     120     130     140     150
KF418820.1 CGAACTGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCTTGAAGT AGGGGATAAC
3021410_LF CGAACTGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCTTGAAGT AGGGGATAAC
KX499351.1 CGAACTGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCTTGAAGT AGGGGATAAC
KT363770.1 CGAACTGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG CCCTTGAAGT AGGGGATAAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160     170     180     190     200
KF418820.1 ACTTGGA AAC AGGTGCTAAT ACCGTATAAC AACCAAAACC ACCTGGTTTT
3021410_LF ACTTGGA AAC AGGTGCTAAT ACCGTATAAC AACCAAAACC ACCTGGTTTT
KX499351.1 ACTTGGA AAC AGGTGCTAAT ACCGTATAAC AACCAAAACC ACCTGGTTTT
KT363770.1 ACTTGGA AAC AGGTGCTAAT ACCGTATAAC AACCAAAACC ACCTGGTTTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210     220     230     240     250
KF418820.1 GGTTTAAAAG ACGGCTTCGG CTGTCACTTT AGGATGGACC CGCGGCGTAT
3021410_LF GGTTTAAAAG ACGGCTTCGG CTGTCACTTT AGGATGGACC CGCGGCGTAT
KX499351.1 GGTTTAAAAG ACGGCTTCGG CTGTCACTTT AGGATGGACC CGCGGCGTAT
KT363770.1 GGTTTAAAAG ACGGCTTCGG CTGTCACTTT AGGATGGACC CGCGGCGTAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260     270     280     290     300
KF418820.1 TAGCTTGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAC
3021410_LF TAGCTTGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAC
KX499351.1 TAGCTTGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAC
KT363770.1 TAGCTTGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGATGATA CGTAGCCGAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310     320     330     340     350
KF418820.1 CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA
3021410_LF CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA
KX499351.1 CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA
KT363770.1 CTGAGAGGGT AATCGGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC CAAACTCCTA

```

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 360 370 380 390 400  
**KF418820.1** CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG  
**3021410\_LF** CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG  
**KX499351.1** CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG  
**KT363770.1** CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 410 420 430 440 450  
**KF418820.1** CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTGTTG  
**3021410\_LF** CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTGTTG  
**KX499351.1** CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTGTTG  
**KT363770.1** CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTAAAAC TCTGTTGTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 460 470 480 490 500  
**KF418820.1** GAGAAGAACA GGTGTCAGAG TAACTGTTGA CATCTTGACG GTATCCAACC  
**3021410\_LF** GAGAAGAACA GGTGTCAGAG TAACTGTTGA CATCTTGACG GTATCCAACC  
**KX499351.1** GAGAAGAACA GGTGTCAGAG TAACTGTTGA CATCTTGACG GTATCCAACC  
**KT363770.1** GAGAAGAACA GGTGTCAGAG TAACTGTTGA CATCTTGACG GTATCCAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 510 520 530 540 550  
**KF418820.1** AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG  
**3021410\_LF** AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG  
**KX499351.1** AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG  
**KT363770.1** AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG

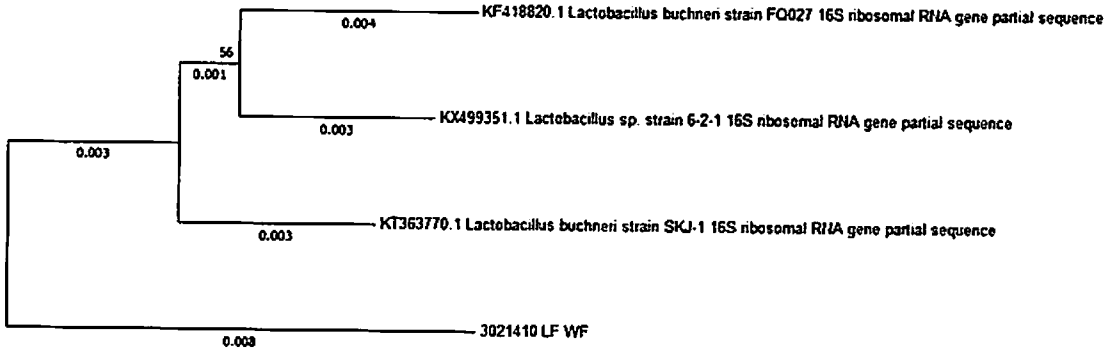
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 560 570 580 590 600  
**KF418820.1** CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT  
**3021410\_LF** CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT  
**KX499351.1** CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT  
**KT363770.1** CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 610 620 630 640 650  
**KF418820.1** AGGTCTGATG TGAAAGCCTT CCGCTTAACC GGAGAAGTGC ATCGGAAACC  
**3021410\_LF** AGGTCTGATG TGAAAGCCTT CCGCTTAACC GGAGAAGTGC ATCGGAAACC  
**KX499351.1** AGGTCTGATG TGAAAGCCTT CCGCTTAACC GGAGAAGTGC ATCGGAAACC  
**KT363770.1** AGGTCTGATG TGAAAGCCTT CCGCTTAACC GGAGAAGTGC ATCGGAAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
 660 670 680 690 700  
**KF418820.1** GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA  
**3021410\_LF** GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA  
**KX499351.1** GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA  
**KT363770.1** GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGACAGTGG AACTCCATGT GTAGCGGTGA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
KF418820.1 AATGCGTAGA TATATGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTGTCTGGTC
3021410_LF AGAGTGGT-- -----
KX499351.1 AATGCGTAGA TATATGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTGTCTGGTC
KT363770.1 AATGCGTAGA TATATGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTGTCTGGTC
    
```





## BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Berdasarkan hasil penelitian tahun kedua, maka perlu dilanjutkan pada tahun ketiga:

### Sampel Penelitian

Mikroba yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat bakteri asam laktat hasil penelitian tahun pertama dan kedua. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya, telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi berdasarkan morfologi, fisiologis, isolasi DNA, amplifikasi gen penyandi 16S DNA, sequencing 16S DNA, phylogenetic tree, ketahanan terhadap keasaman, ketahanan terhadap bile salt, antagonis terhadap bakteri enteric patogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

### Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian:

Alat yang digunakan untuk pengambangan isolat BAL adalah autoklaf, autoklaf, beaker glass, tabung reaksi, bunsen, rak tabung reaksi, cawan Petri, tabung Durham, tabung sentrifuge, tabung Erlenmeyer, pipet 1 ml, 5 ml, 10 ml, Ose, rak tabung, Mikropipet (*Eppendorf*), laminar flow, tip pipet, inkubator, pH-meter.

Bahan yang digunakan adalah MRS-Broth (Oxoid), MRS-Agar (Oxoid), akuades steril, alkohol 70%, isolate bakteri asam laktat hasil penelitian tahun pertama dan kedua, antibiotika (Virginiamycin), desinfektan *benzalkonium chloride* 10%, air bebas *chlorine*, hewan coba ayam petelur, pakan tanpa antibiotika, dan bakteri *E. coli*.

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

## Prosedur dan pengumpulan data

### Persiapan Kultur isolat BAL

Isolat ditumbuhkan pada media MRSB (Oxoid) dalam kondisi fakultatif an aerob dalam jangka waktu 18-20 jam pada suhu 37°C. Setelah ditumbuhkan dalam waktu tersebut, dilakukan pemanenan dengan cara dilakukan sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3500 rpm. Selanjutnya supernatant yang diperoleh dibuang serta pellet dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan 0,1% pepton water. Selanjutnya dilakukan rekonstitusi menggunakan larutan 10% susu skim + 1% MSG steril serta ditambahkan 20% gliserol. Masing-masing cryotubes sesegera mungkin dilakukan pembekuan pada suhu -80°C untuk dapat digunakan selanjutnya. Pada tiap percobaan digunakan kultur stok yang selanjutnya diinokulasikan pada media. Setiap isolate bakteri disubkultur pada media MRSB sebanyak dua kali sebelum dipakai untuk pengujian.

### Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana menggunakan 6 perlakuan 4 ulangan dan setiap ulangan berisikan 5 ekor ayam petelur. Pemberian pakan sebanyak 150 g/ekor/hari dan minum diberikan secara *ad libitum* selama 6 minggu perlakuan. Bakteri *E. coli* 10<sup>6</sup> CFU/ml probiotik *Lactobacillus casei* 10<sup>7</sup> CFU/g dan *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>7</sup> CFU/g diberikan secara oral melalui air minum.

Tabel 4.1 Analisis Faktorial Penentuan Kelompok Perlakuan

	<i>Escherichia coli</i>	Faktor 2		
		Kontrol (a)	Antibiotika (b)	Probiotik (c) <i>L.casei</i> dan <i>L.acidophilus</i>
Faktor 1	Tidak diinfeksi (a)	1a2a	1a2b	1a2c
	Diinfeksi (b)	1b2a	1b2b	1b2c

**Keterangan:**

1a2a: kontrol negatif, ayam tidak diinfeksi *E.coli* dan tidak diberikan antibiotika atau probiotik

1a2b: ayam tidak diinfeksi *E.coli* dan diberikan 0,1% antibiotika

1a2c: ayam tidak diinfeksi *E.coli* dan diberikan 0,5% probiotik *L.casei* dan 0,5% *L.acidophilus*

1b2a: kontrol positif, ayam diinfeksi *E.coli* dan tidak diberikan antibiotika atau probiotik

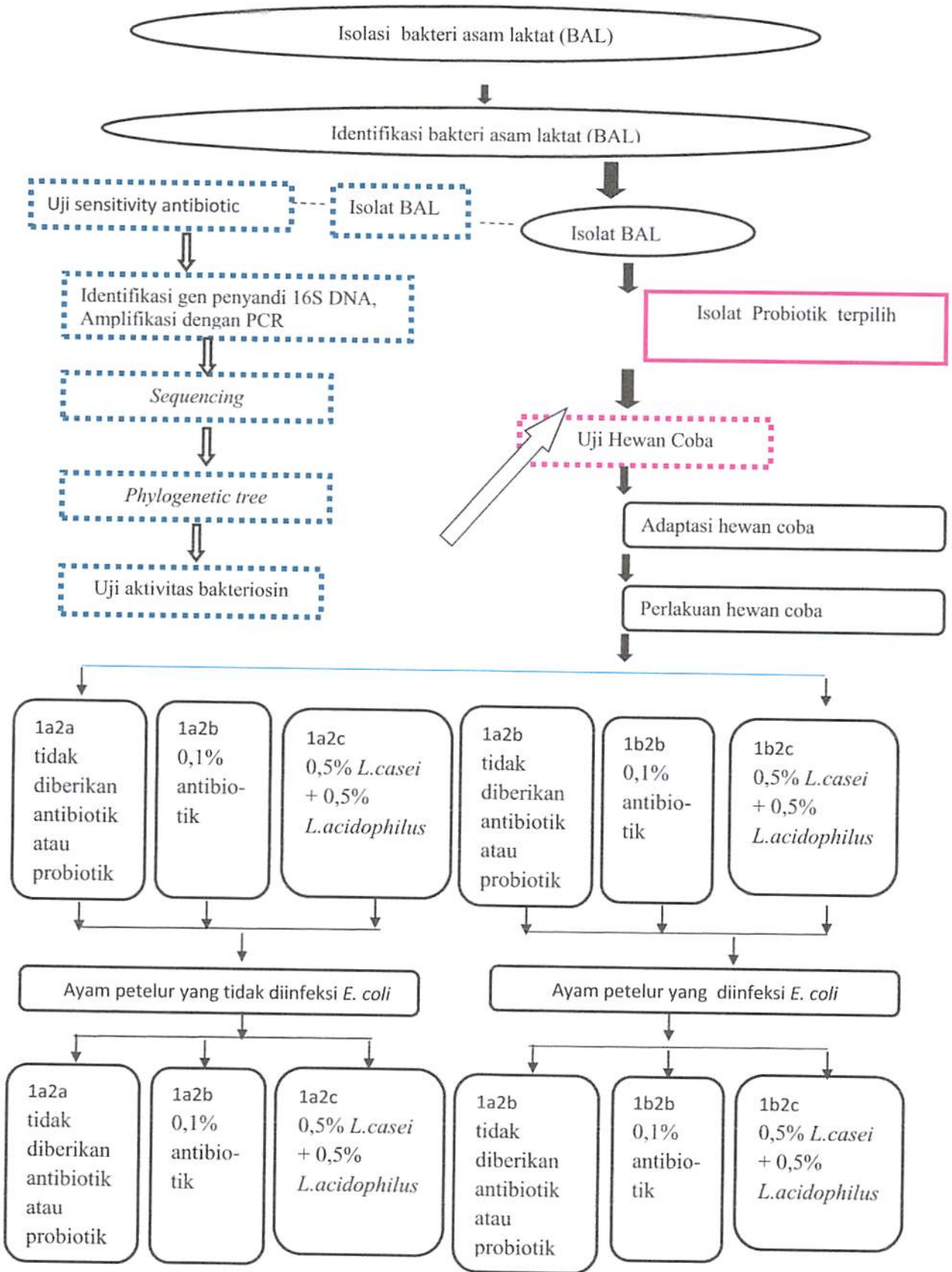
1b2b: ayam diinfeksi *E.coli* dan diberikan 0,1% antibiotika

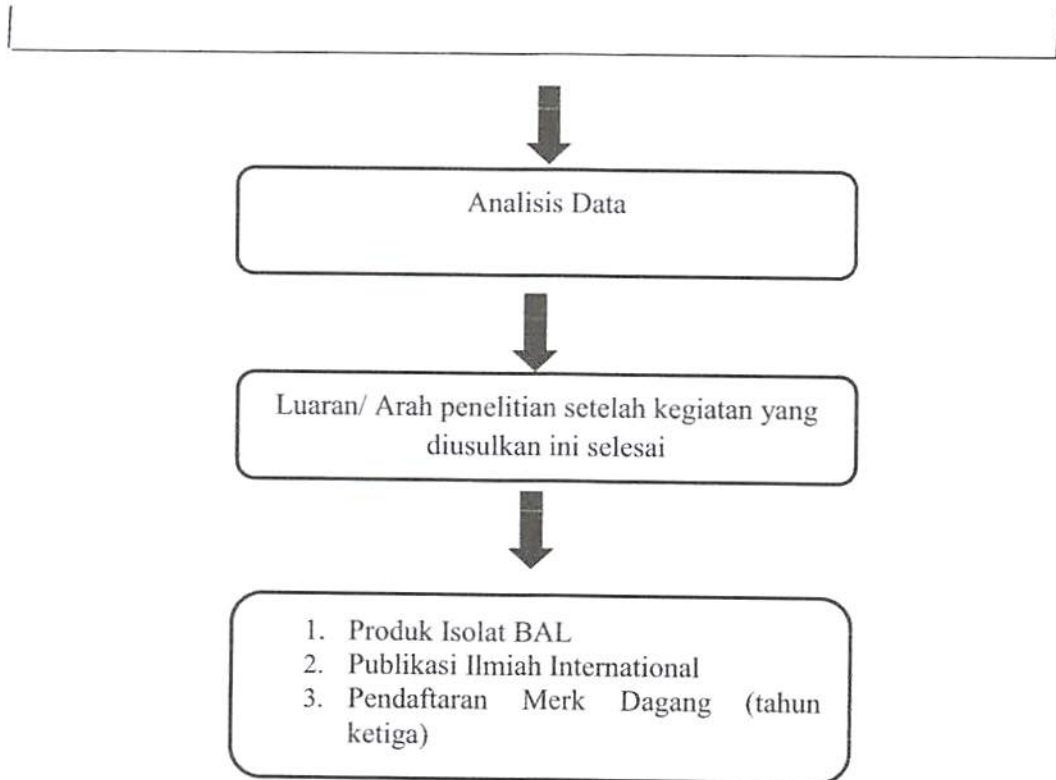
1b2c: ayam diinfeksi *E.coli* dan diberikan 0,5% probiotik *L.casei* dan 0,5% *L.acidophilus*

**Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan yang diberikan. Apabila diperoleh hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) atau berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (Kusriningrum, 2008).







Gambar 4.2. Bagan Alir Penelitian

Keterangan:

Tahun ke-1: telah dilakukan

Tahun ke-2: sudah dilakukan

Tahun ke-3: akan dilakukan

## BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Dapat diidentifikasi gen pengkode 16S DNA isolat bakteri asam laktat
2. Dapat dihasilkan *phylogenetic tree* berdasarkan susunan nukleotida pada genom 16S DNA.
3. Dapat dibuktikan adanya bakteriosin yang dihasilkan oleh isolat BAL
4. Dapat dibuktikan kemampuan bakteriosin dari isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri enteric pathogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Balevi, T., U.S.U. An, B. Covkun, V.Kurto..lu and S.S. Etingul, 2001. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response. *British Poult. Sci.* 42:456-461.
- Barrow, P.A. 1992. Probiotics for Chickens. In *Probiotics the Scientific Basis*. Edited by Fuller Chapman and Hall. London. New York. Tokyo. Melbourne. Madras. p. 225-232.
- Bernardeau, M., J.P. Vernoux, S.H. Dubernet, and M. Guéguen. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. of Food Micro.* 126: 278-285.
- Cogliani C, Goossens H, Greko C. 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: a lesson from Europe. *Microbe.* 6:274-280.
- Chotiah,S. 2003. Potensi Bakteriosin Untuk Kesehatan Hewan Dan Keamanan Bahan Pangan. *Wartazoa Vol 23 No 2*, p: 94-101.
- Galdeano MC, Moreno LA, Vinderola G, Bibas BME, Perdigon G. Mecakinsme Of Immunomodulation Induced by Probiotik Bacteria. *AmJ Clin Vaccine Immunol.* .2007;14;485-92
- Hardjosworo, P.S. dan Rukminasih. 2000. Peningkatan Produksi Ternak Unggas. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Harijani, N., 1997. Pengaruh Bakteriosin sebagai Biopreservasi pada Daging Segar dalam Kemasan dan Profil Aktivitas Antibakterial. Tesis. Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Holzaptel, W.H., P. Haberer, R. Giesen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganism in Food and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: no. 2, 365s-373s.
- Jaya, T.P. 2012. Pengaruh Probiotik (Kombinasi bakteri *Lactobacillus sp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces albus*, *Bacillus subtilis*) terhadap Konversi Pakan Ayam Pedaging. Skripsi. Universitas Ailangga. Surabaya.
- Jenie, S.L., dan E.R. Shinta. 1995. Aktivitas Antimikroba dari Beberapa Spesies *Lactobacillus* terhadap Mikroba Patogen dan Perusak Makanan. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan.* 7(2) : 46-51.
- Jin, L.Z., Y.W. Ho, M.A. Ali, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1996. Effect of Addherent *Lactobacillus* sp. On in vitro Adherence of Salmonellae to the Intestinal Epithelial Cells of Chickens. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 201-206.
- Kompiang, I., 2002. Pengaruh ragi: *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi laut sebagai pakan imbuhan probiotik terhadap kinerja unggas. *JITV*, 7(1), pp.18-21.

- Kusriningrum, R.S. 2012. Perancangan Percobaan. Cetakan Ketiga. Airlangga University Press. Surabaya. hlmn 15.
- Lee, Y.K. and S. Salminen. 2009. Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2nd ed. A John Wiley and Sons, Inc., Publication New York, USA. 180: 271-284.
- Lokapirnasari, W. P., Nazar, D. S., Nurhajati, T., Supranianondo, K., & Yulianto, A. B. (2015). Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya Abattoir, Indonesia. *Veterinary World*, 8(3), 367-371.
- Lokapirnasari, W. P., and A.M. Sahidu. 2015. Rekayasa Formula Pakan Melalui Produksi Mikroba Selulolitik dan Crude Fish Oil Untuk Produksi Daging Ayam Rendah Kolesterol dan Diperkaya *docosahexaenoic acid* (DHA) Dalam Rangka Meningkatkan Ketahanan Pangan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Legowo, S., A.M. Mulyani dan A.A. Mahananni. 2008. Viabilitas Bakteri Asam Laktat, Keasaman dan Waktu Pelelehan Es Krim Probiotik Menggunakan Starter *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium bifidum*. *J. Indo. Trop. Anim. Agric.*, vol. 33 (2) hlmn. 120-125.
- Mackie B. 2011. Lessons from Europe on reducing antibiotic use in livestock. *BCMJ*. 53:487.
- Margawani, K.R. 1995. *Lactobacillus casei* galur Shirota (Bakteri Yakult), Peranannya dalam Kesehatan Manusia. *Buletin Teknologi Industri Pangan*. Vol. VI (2): 93-94.
- McNaught, C.E., and J. MacFie, 2000. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr. Research* 21 : 343-353.
- Medine, R., M. Katz., S. Gonzales, and G. Oliver. 2001. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from North West Argentina. *Journal of Food Protection* Vol. No. 4.p. 559-63.
- Nilsen T., I.F.Nes and H.Holo. 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG. 2333. *Appl. and Environmental Microbiology* May.p.2975-2984
- Parakkasi. A. 1990. Ilmu Gizi dan Makanan Ternak Monogastrik. Angkasa. Bandung. hlmn 11; 24; 31-32.
- Presetyo D H, Purwanto B. 2010. Efek Probiotik pada kadar IgA Mencit model sepsis. *MKB*. Vol. 42.No.4. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Rahayu, E. 2011. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *J. Antibiotika Resistensi*. 4 (1): 191-198.

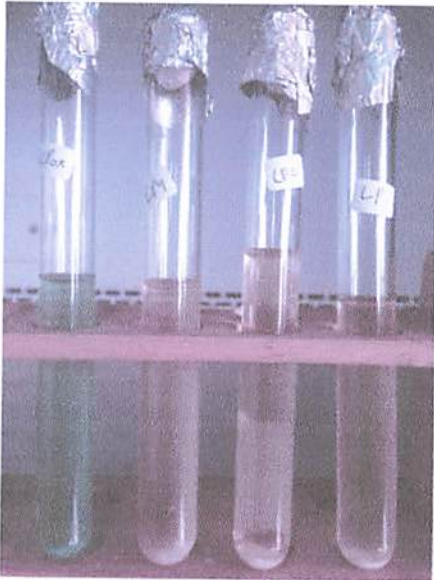
- Ramia, I.K. dan I.Gst.Nym.Gde. Bidura. 2000. Suplementasi Probiotik dalam Ransum Berprotein Rendah terhadap Penampilan dan Karkas Itik. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Bali.
- Rasyaf, M. 1994. Meningkatkan Produktifitas Ayam Ras Pedaging. Penebar Swadaya. Jakarta. hlmn 17-20; 41.
- Rasyaf, M. 2008. Panduan Beternak Ayam Pedaging. Penebar Swadaya. Jakarta. hlmn 14; 21-23; 54-60; 98-102.
- Ray, B. and A. Bhunia. 2008. Microbial stress response in the food environment. Fundamental food microbiology. Ed 4. CRC Press. New York. p 83-86.
- Regar M.N., R. Mutia, S.D.Widhyari, Y.H.S.Kowel. 2014. Pengaruh pemberian ransum kombinasi suplemen herbal dengan mineral zink terhadap jumlah leukosit, Eritrosit, dan kadar hemoglobin broiler yang Diinfeksi *Escherichia Coli*. Jurnal zoetek ("zoetek journal") Vol 34 No 2: 82 – 88
- Santoso, H. 2009. Pembesaran Ayam Pedaging di Kandang Panggung Terbuka. Penebar Swadaya. Jakarta. hlmn 17-18.
- Socharsono, L. Andriani, R. Safitri, O. Sjoifjan, S. Abdullah, R. Rostika, H.A.W. Lengkey dan A. Musyawwir. 2010. Probiotik (Basis Ilmiah, Aplikasi dan Aspek Praktis). Widya Padjadjaran. Bandung. hlmn 1-2; 32-34; 59; 167-170; 172-174.
- Soeparno. 2005. Ilmu dan Teknologi Daging. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sri Sinto Dewi, Herlisa Anggraini 2015. *Lactobacillus plantarum* of breastmilk isolate activity in wistar rat's immunoglobulin (IgA,IgG). *The 2<sup>nd</sup> University Research Coloquium*. Universitas Muhammadiyah Semarang
- Sudirman, I., E.A. Siregar, R Na'im. 1995. Pemanfaatan BAL Penghasil Bakteriosin sebagai Bibit Starter Unggul dan Biopreservasi pada makanan. Laporan Penelitian. Hibah Bersaing IV. Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 1995/1996. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Sumarsih, S., Sulistiyanto, B., Sutrisno, C.I. and Rahayu, E.S., 2012. Peran Probiotik Bakteri Asam Laktat Terhadap Produktivitas Unggas (The role of lactic acid bacteria probiotic on the poultry's productivity). *Jurnal Litbang Provinsi Jawa Tengah*, Vol.6 10 No.1
- Suprijatna, E., A. Umiyati, dan K. Ruhyat. 2005. Ilmu Dasar Ternak Unggas. PT. Penebar Swadaya. Jakarta. hlmn 41.
- Tillman, A.D., G. Hartadi, S. Reksohadipardjo, S. Prawirokusumo, S. Lepdosoejojo. 1991. Ilmu Makanan Ternak Dasar, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada. UGM Press. Yogyakarta. hlmn 14.

- Utomo, A.M. 2012. Pengaruh Pemberian Probiotik dengan Campuran *Lactobacillus sp.* dan *Saccaromyces cerevisiae* terhadap Pertambahan Berat Badan Ayam Pedaging. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Villena, J; M. Medina, E. Vintinfii. 2008. Stimulation of Respiratory Immunity by oral administration of *Lactobacillus lactis*. *Can J. Microbiol* 54 (8) : 630 -638
- Wahyu, J. 1997. Ilmu Nutrisi Unggas. Cetakan ke-4. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlmn 18-20; 41.
- Wahju, J. 2007. Ilmu Nutrisi Unggas. Gajah Mada University. Yogyakarta.
- Walter. J.C., Hertel, G.W. Tannock, C.M. Lis, K. Munro, W.P. Hammes. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella sp.* in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. June.p.2578-2585.
- Widyastuti, E. 2011, Teknologi Pengolahan Hewani Probiotik & Prebiotik. Ilmu dan Teknologi pangan, Univeritas Brawijaya. Malang. hlmn 23.



Lampiran. LUARAN

1. Produk Isolat BAL



Lampiran 2. Seminar International

105



## Lampiran 3. Pendaftaran HAKI (merek)

**FORMULIR PERMOHONAN PENDAFTARAN MEREK INDONESIA**  
**APPLICATION FORM OF TRADEMARK REGISTRATION OF INDONESIA**

**Data Permohonan (Application)**

Nomor e-Filing : WFT2017017276  
*Number of e-Filing*

Tanggal : 2017-10-12

Permohonan

*Date of Submission*

Nomor Permohonan : D102017051604  
*Number of Application*

Jenis Permohonan : Merek Dagang Non  
*Type of Application* UMKM

**Rincian Merek (Description of Mark)**

Nama Merek : Bio MC4 + logo

*Name of Mark*

Arti : suatu penamaan

*Meaning*

Warna : hijau, merah, hitam

*Colors*

Disclaimer : kata; logo; warna pada merek

*Disclaimer*

Etiket Gambar  
*Image of Mark*

**Pemohon (Applicant)**

Nama (Name)

Alamat (Address)

Surel/Telp. (Email/Phone)

Dr. Widya Paramita Lokapimasari, drh. MP  
 JL. ASEM BAGUS 4/11, Surabaya,  
 60173, Indonesia

widyaparamitalokapimasari@gm  
 ail.com  
 085731469579

**Kelas Barang/Jasa (Class of Goods / Services)**

Kode

(Class)

5

Jenis Barang/Jasa (Description of Goods/Services)

PROBIOTIK UNTUK HEWAN;

**Data Prioritas (Priority Data)**

Negara (Country)

Nomor (Number)

Tanggal (Date)

**Kuasa/Konsultan KI (Representative/IP Consultant)**

Nama (Name)

Alamat (Address)

Surel/Telp. (Email/Phone)

**Lampiran (Attachments)**

Fotokopi KTP

Surat Pernyataan Kepemilikan

Jakarta, 2017-10-12

Pemohon / Kuasa

*Applicant / Representative*

Tanda tangan / Signature

Nama lengkap / Full Name Kanwil Jawa Timur

Signature valid



Halaman 1

**RESEARCH NOTE****IN VITRO pH TOLERANCE, BILE SALT RESISTANCE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Lactobacillus plantarum* ISOLATED FROM CROSSBRED CATTLE**

Widya Paramita Lokapirnasari<sup>1</sup>, Adriana Monica Sahidu<sup>2</sup>, Lilik Maslachah<sup>3</sup>,  
Koesnoto Soepranianondo<sup>1</sup>, A. Berny Yulianto<sup>4</sup>, Dian Afikasari<sup>4</sup>,  
Teguh Bagus Pribadi<sup>4</sup> and Irma Hariyati<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine; <sup>2</sup>Department of Marine, Faculty of Fisheries and Marine; <sup>3</sup>Department of Basic Medicine, Veterinary Pharmacy Laboratory; <sup>4</sup>Faculty of Veterinary Medicine; Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia

**ABSTRACT**

This research was done to evaluate the characteristics and probiotic potential of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the small intestine of ten three year-old male Ongole crossbred cattle. Ten-centimeter samples were obtained from each small intestine, wastes were removed then samples were placed in sterile sample bottles, and immediately taken to the laboratory for bacterial isolation. The LAB isolates were subjected to low pH tolerance (pH 2 and 4), bile salt resistance, and antimicrobial activity against enteric pathogens *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli*. Biochemical assay indicated that isolate was gram positive, rod-shaped, catalase negative, and capable of fermenting glucose, mannitol, xylose, rhamnose, sucrose, lactose, arabinose, raffinose and sorbitol. Biochemical and morphological identification suggests that the isolate was *Lactobacillus plantarum* WPL 117 (strain number of control indicator organisms was *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917). This isolate was able to survive at low pH (2 and 4), tolerated 0.3% bile salts, and capable of inhibiting *S. aureus* and *E. coli*. Thus, this isolate can be considered a probiotic candidate for further study.

**Key words:** antimicrobial activity, bile salt, lactic acid bacteria, pH tolerance

*Philipp. J. Vet. Med.*, 55(SI): 73-78, 2018

**INTRODUCTION**

Lactic acid bacteria (LAB) have been widely used as a preservative supplement in food and feed industry, and have been known to reduce the use of antibiotics in food products for humans and feed products for livestock. This is due to their ability to produce potent bacteriocins, which, are antimicrobial peptide substances (Woraprayote *et al.*, 2016; Seddik *et al.*, 2017). LAB can be found in different environments: in animal gut, human gut, food and water (Ahmed, 2003). *Lactobacillus*

*plantarum*, a widely used probiotic, is among the LAB that can ferment a variety of carbohydrates. It is also used as a starter culture for food and feed fermentation (Siezen and van Hylckama Vlieg, 2011; da Silva Sabo *et al.*, 2014).

A probiotic is a non-pathogenic living microorganism, which, when consumed in adequate amounts, can provide health benefits to its host (FAO/WHO, 2006). There are a number of benefits to using probiotics: increased utilization of nutrients, decreased use of antibiotics, reduction in serum cholesterol level (Guo *et al.*, 2010), and

**\*FOR CORRESPONDENCE:**

(email: widyaparamitalokapirnasari@gmail.com)

promotion of balance in gut microbiota (Saez-Lara *et al.*, 2015). Addition of *L. casei* probiotic in chicken feeds was found to improve feed consumption (g/hen) and increase egg mass (g/hen/day) and egg weight (g) (Griggs and Jacob, 2005). Benefits seen in the study include maintenance of normal intestinal microbiota and improved nutrition by detoxifying hazardous compounds in feeds and denaturing potentially indigestible components in the diet with hydrolytic enzymes amylases and proteases (Fuller, 1989; Balcazar *et al.*, 2006; Suzer *et al.*, 2008).

Lactic acid bacteria are the most common microorganisms used as probiotics in livestock production, including species from the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* (Garcia *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016). *Lactobacillus* consists of 135 species, 27 subspecies and a heterogeneous group (Bernardeu *et al.*, 2008). The small intestines of healthy Ongole crossbreed beef cattle may contain lactic acid bacteria which can be used as probiotics. For this reason, this study sought to find and characterize a new strain of lactic acid bacteria isolated from Ongole crossbreed beef cattle, capable of surviving in low pH, bile salts, and possess antimicrobial activity – conditions that define a probiotic. Identification of isolates for probiotic use can contribute in increasing livestock productivity.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Ten healthy 3-year old, 300-400 kg, male Ongole crossbreed beef cattle from a slaughterhouse in Surabaya, Indonesia were used in the study. Cattle were considered apparently healthy based on nutrition and overall health management and deworming frequency of every three months.

### Sample collection and cultivation

Slaughtering of cattle was carried out in accordance to Halal regulations. After slaughtering, all internal organs were removed, and 10 cm samples of small intestines were collected. Wastes were removed and samples were placed into sterile

sample bottles, and immediately taken to the laboratory for isolation process.

Collection and cultivation of samples were adopted from Rajoka *et al.* (2018), with some modifications. Samples were diluted in PBS solution (0.1 M, pH 7.4) (Merck, Germany). One hundred  $\mu$ l of diluted samples were spread onto sterilized de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar media (Merck, Germany), incubated at 37°C for 3 days to obtain single colonies and select for further characterization.

### Screening and identification of LAB isolates

Selected LAB isolates were subjected to biochemical assay, morphological examination, catalase test and gram staining. Isolates that were observed as rod-shaped, catalase negative, and gram positive were suspended on MRS broth (Merck, Germany) and supplemented with 20% glycerol at -80°C. Prior to assay, LAB isolates were grown in MRS broth medium for further experiments (Leite *et al.*, 2015).

### *In vitro* pH tolerance, bile salt resistance and antimicrobial activity

Bile salt and acid tolerance were determined, with some modifications according to the methods described by Rajoka *et al.* (2018). The isolates were grown in MRS broth at 37°C for 24 h and subcultured (1%, v/v) in sterilized MRS medium. For *in vitro* pH tolerance, overnight cultures of isolates were spotted on MRS agar plates adjusted to pH 2.0 and pH 4.0 with 3 M HCl solution (Merck, Germany). Colonies that survived were counted after incubation at 37°C for 24 h.

Bile tolerance assay was conducted using modified methods of Lee *et al.* (2016). Overnight cultures of LAB isolated were inoculated (1% v/v) in MRS medium 1% (w/v) Oxgall. Overnight cultures of isolates were spotted on MRS agar plates supplemented with 0.3% bile salts, specifically 50% cholic acid sodium salt and 50% deoxycholic acid sodium salt (Sigma-Aldrich, 48305). Plates were incubated under microaerophilic conditions at 37°C for 24 h. Precipitated bile salts around the colonies denote positive result. This procedure was performed twice.

### Antimicrobial assay

Antimicrobial assay was carried out based on the methods of Adeniyi *et al.* (2015), with some modifications. Isolated bacterial culture (200  $\mu$ l) was inoculated in MRS broth at 37°C and incubated for 24 h under microaerophilic conditions. After incubation, a loopful of isolate was inoculated on MRS agar plate and incubated at 37°C for 24 h in facultative aerobic conditions. MRS agar plates were then overlaid with approximately 0.2 ml x 10<sup>7</sup> CFU/ml of overnight broth culture of *E. coli* (APEC/ Avian pathogenic *Escherichia coli*) and *S. aureus* (Avian pathogenic *Staphylococcus aureus*) assays, inoculated in 10 ml of MRS agar, and incubated at 37°C under facultative aerobic conditions. A clear zone in the agar plate indicates bacteriocin inhibition (Ravi *et al.*, 2015).

## RESULTS AND DISCUSSION

Lactic acid bacteria were successfully isolated from the samples using a selective medium of MRS agar. Identification classified the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* WPL 117 as gram positive, catalase-negative and rod-shaped. These results show similarities with the studies done by Ahmed (2003) and Leite *et al.* (2015), wherein isolates had the same biochemical characteristics, and lactic acid was the metabolic end product from carbohydrate fermentation. Based on this study, five similar LAB strains were isolated from the intestine wastes, and all isolated strains underwent gram staining, catalase test and morphological examination, until one isolate that matched the desired characteristics was selected for optimization. Table 1 shows the biochemical characteristics of the isolate *L. plantarum* WPL 117.

The *L. plantarum* WPL 117 isolate was able to ferment glucose, mannitol, xylose, rhamnose, sucrose, lactose, arabinose, raffinose and sorbitol. Positive reaction signifies the presence of enzymatic activity. Some lactic acid bacteria have the enzymes  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -Glu),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) (de Vrese *et al.*, 2001) and enzymes that can hydrolyze lactose (Roy and Ward, 1990). *Lactobacillus*

*plantarum* C182 have enzymes, including  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -Gal),  $\beta$ -Gal,  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -Glu), and  $\beta$ -Glu 6.14, 118.45, 52.38, 168.25 (U/mg of protein). Characteristics that define lactic acid bacteria are tolerance to acidic conditions and bile salt. Therefore, the ability of the isolates to survive in acidic conditions and bile salt were tested *in vitro*.

Table 2 shows the survival rate of *L. plantarum* WPL 117 to acid and bile salt tolerance after 24 h of incubation at pH 2 and pH 4. *In vitro* low pH tolerance study revealed that isolates at pH 2 and 4 showed equal viability compared to pH 7 (control), suggesting that *L. plantarum* WPL117 strain can survive in simulated gastrointestinal tract conditions. This is in agreement with the study done by Argyri *et al.* (2013) where they reported that four *L. plantarum* strains demonstrated survival at low pH after 3 h of exposure (highest final population >8 log cfu/ml). Bactericidal effect in the GIT occurs at pH under 2.5 (Suroño, 2003). Corcoran *et al.* (2005) reported that *Lactobacillus* resistance to low pH can be attributed to its F0F1-ATPase activity. *Lactobacillus* can produce lactic acid and inhibit pathogenic bacterial growth by creating acidic conditions.

Meanwhile, bile salt is toxic to cells, and it tends to damage the structure of cell membrane. This is why tolerance to bile salt is considered one of the essential properties, which enable lactic acid bacteria strains to survive in the gastrointestinal tract (Rajoka *et al.*, 2018). Their resistance to bile salt and acidic condition contributes to their overall ability to withstand harsh conditions in the GIT (de Vrese *et al.*, 2001).

This study showed that *L. plantarum* WPL117 strain was resistant to bile salts. Biomass (cell dry matter) of the isolate was 22.6 mg/100 ml. This value indicates that the isolate can hydrolyze the bile salt and thus, tolerates it to a certain level. Presence of the biomass after growth in MRS agar plate supplemented with 0.3% bile salt supports this claim.

One of the conditions that qualifies a lactic acid bacteria as a probiotic is resistance to 0.3% bile salts, since this concentration is relatively the same as that found in the

Table 1. Biochemical characteristics of *L. plantarum* WPL 117 isolated from crossbred cattle.

Substrate	Reaction	Substrate	Reaction	Substrate	Reaction
Lysine	-	Urease	-	Rhamnose	+
Ornithine	+	VP	-	Sucrose	+
H <sub>2</sub> S	-	Citrate	+	Lactose	+
Glucose	+	TDA	-	Arabinose	+
Mannitol	+	Gelatine	-	Adonitol	-
Xylose	+	Malonate	+	Raffinose	+
ONPG	+	Inositol	-	Salisin	-
Indole	-	Sorbitol	+	Arginine	-

Table 2. Survival rate of *L. plantarum* WPL 117 isolated from crossbred cattle to low pH and bile salt.

Survival of <i>L. plantarum</i> WPL 117	Biomass (cell dry weight) (mg/100 ml)			
	MRS broth control (pH 7)	MRS broth (pH 2)	MRS broth (pH 4)	MRS broth (ox bile salt)
	50.2	50.1	49.9	22.6

intestine (Leite *et al.*, 2015). In this study, isolate WPL 117 was found resistant to 0.3% bile salts. This result is similar with other studies, which showed that five *L. plantarum* strains were resistant to bile salts after having exhibited partial bile salt hydrolase activity. *L. plantarum* was found similar with probiotic *L. casei* Shirota strains and *L. rhamnosus* GG (Argyri *et al.*, 2013). The study of Rajoka *et al.* (2018) showed that 13 isolates of *Lactobacillus* sp. in MRSc medium supplemented with 0.5 and 1% bile salt after 12 h incubation showed resistance to various concentrations of bile salt. This suggests that increasing bile salt concentration translates to a corresponding decrease in growth rate of lactic acid bacteria.

The ability of crude bacteriosin produced by the isolated strain *L. plantarum* WPL 117 was evaluated *in vitro*. Table 3 shows the diameter of inhibition zone of the isolate. Result demonstrates that crude bacteriosin from *L. plantarum* WPL 117 was able to inhibit *E. coli* and *S. aureus*. Bacteriocin-producing strains may be used as protective

cultures to improve food safety. Likewise, the purified or crude form of these antimicrobial agents may also be applied directly as food preservatives. Different bacteriocins produced by *L. plantarum* are isolated from fermented food products, with particular emphasis on their genetic and biochemical properties. A number of bacteriocins including plantaricin A, plantaricin B, plantaricin C, plantaricin F, plantaricin BN, plantaricin S and T, plantaricin SA6, and C19 are produced by *L. plantarum* (Olasupo, 1996). *Lactobacillus* has been considered safe for human and livestock use, particularly in dairy cow farming (Tagg and Dierksen, 2003; Maragkoudakis *et al.*, 2006).

This study found that the isolated *Lactobacillus plantarum* WPL 117 survived at low pH (pH 2 and pH 4), was resistant to 0.3% bile salts, and exhibited antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*, qualifying it as a potential probiotic. It is recommended to conduct molecular and *in vivo* test on animals to verify its potential as a probiotic.



Table 3. Inhibition zone of crude bacteriosin from *L. plantarum* WPL 117 isolated from cross-bred cattle.

Diameter of inhibition zone (mm)		
Crude bacteriosin (mm)	<i>Escherichia coli</i>	20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9

## ACKNOWLEDGMENT

The research study was supported by PTUPT 2018. The authors wish to acknowledge the Ministry of Research and Technology of Higher Education, and the Director, Dean, and Head of Institute of Research and Innovation of Universitas Airlangga for their support.

## REFERENCES

- Adeniyi BA, Adetoye A and Ayeni FA. 2015. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *African Health Sciences* 15(3): 888-895.
- Ahmed FE. 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends in Biotechnology* 21(11): 491-497.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ and Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology* 33(2): 282-291.
- Balcazar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D and Muzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114(3): 173-186.
- Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S and Gueguen M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126: 278-285.
- Borrero J, Kelly E, O'Connor PM, Kelleher P, Scully C, Cotter PD, Mahony J and van Sinderen D. 2017. Purification, characterization and heterologous production of plantaricyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NI326. *Applied and Environmental Microbiology* AEM-01801.
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF and Ross RP. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 3060-3067.
- da Silva Sabo S, Vitolo M, González JMD and de Souza Oliveira RP. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International* 64:527-536.
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C and Schezenmeir J. 2001. Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 421s-429s.
- Food and Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO). 2006. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome [Italy]: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66(5): 365-378.
- Garcia-Hernandez Y, Perez-Sanchez T, Boucourt R, Balcazar JL, Nicoli JR, Moreira-Silva J, Rodriguez Z, Fuertes H, Nuñez O, Albelo N and Halaihel N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science* 108: 125-132.
- Griggs JP and Jacob JP. 2005. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applied Poultry Research* 14: 750-756.
- Guo XH, Kim JM, Nam HM, Park SY and Kim JM. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in*

- in vitro* functional properties. *Anaerobe* 16(4): 321-326.
- Lee KW, Shim JM, Park SK, Heo HJ, Kim HJ, Ham KS and Kim JH. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT-Food Science and Technology* 71: 130-137.
- Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VM, Mayo B and Delgado S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science* 98(6): 3622-3632.
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B and Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16(3): 189-199.
- Olasupo NA. 1996. Bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods. *Folia Microbiologica* 41(2): 130-136.
- Rajoka MSR, Hayat HF, Sarwar S, Mehwish HM, Ahmad F, Hussain N, Shah SZH, Khurshid M, Siddiqu M and Shi J. 2018. Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology* 87(1): 116-126.
- Ravi V, Prabhu M and Subramanyam D. 2015. Isolation of bacteriocin producing bacteria from mango pulp and its antimicrobial activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1(2): 54-63.
- Roy D and Ward P. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology* 69(5): 739-749.
- Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J and Gil A. 2015. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomedical Research International*. 2015: 1-15.
- Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G and Drider D. 2017. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9(2): 111-122.
- Siezen RJ and van Hylckama Vlieg JE. 2011. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* 10(Suppl 1): S3.
- Surono IS. 2003. *In vitro* probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16(5): 726-731.
- Suzer C, Çoban D, Kamaci HO, Saka Ş, Firat K, Otgucuoglu Ö and Küçüksari H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280(1): 140-145.
- Tagg JR and Dierksen KP. 2003. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends in Biotechnology* 21(5): 217-223.
- Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S and Visessanguan W. 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* 120: 118-132.