

# Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis*) dan kaitannya dengan gen plantarisin A (*plnA*)

## Antibacterial activity test of *Lactobacillus plantarum* isolated from passion fruits (*Passiflora edulis*) and its relation to plantarisin gene (*plnA*)

TITIN YULINERY<sup>✉</sup>, NOVIK NURHIDAYAT

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8765066, Fax. +62-21-8765062, ✉email: tyulinery@yahoo.co.id

Manuskrip diterima: 5 Desember 2014. Revisi disetujui: 30 Januari 2015.

**Abstrak.** Yulinery T, Nurhidayat N. 2015. Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis*) dan kaitannya dengan gen plantarisin A (*plnA*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2)*: 270-277. *Lactobacillus plantarum* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen karena bakteri ini menghasilkan bakteriosin yang disebut dengan plantaricin. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antibakteri dan mendeteksi gen *plnA* pada *L. plantarum* terseleksi dari buah markisa. Sepuluh isolat *L. plantarum* dari buah markisa diuji aktivitasnya dengan bakteri uji *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA dari isolat terseleksi, kemudian Gen *plnA* dideteksi dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *plnA*. Analisis gen *plnA* dilakukan dengan membandingkan tingkat homologinya yang terdapat di sumber data Genbank. Hasil dari uji aktivitas antibakteri diperoleh 4 isolat *L. plantarum* MarB4, Mar8, MarA7, dan MarA5 dengan zona hambat pertumbuhan relatif lebih besar dari pada isolat uji yang lain. Hasil pengujian dengan PCR memberikan hasil yang positif untuk gen *plnA* dengan ukuran produk sekitar 400-500 bp. Hasil sekuensing memiliki homologi 100% dengan isolat *L. plantarum*, hal ini menunjukkan bahwa gen *plnA* dapat dideteksi dari isolat *L. Plantarum* terseleksi dari buah markisa yang mempunyai aktivitas antimikroba.

**Kata kunci:** Antibakteri, gen *plnA*, buah markisa, *Lactobacillus plantarum*

**Abstract.** Yulinery T, Nurhidayat N. 2015. Antibacterial activity test of *Lactobacillus plantarum* isolated from passion fruits (*Passiflora edulis*) and its relation to plantarisin gene (*plnA*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2)*: 270-277. *Lactobacillus plantarum* is able to inhibit the growth of pathogenic bacteria because it produces bacteriocin, known as plantaricin. This study is aimed to test the antibacterial activity and detect the *plnA* gene of *L. plantarum* isolated from passion fruits (*Passiflora edulis* Sims). Ten isolates of *L. plantarum* were tested for the level of inhibitory activity to bacterial pathogen *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* using diffusion method. DNA was extracted from selected isolates and the *plnA* gene was PCR-amplified with its specific primers for *plnA*. Analysis of *plnA* gene was done by comparing the level of homology in the Genbank's data sources. The results showed that *L. plantarum* isolates MarB4, Mar8, MarA7 and MarA5 exhibited larger inhibition zone than the other isolates. The PCR amplification showed a positive indication of gene *plnA* with product size about 400-500 bp. Sequencing analysis showed 100% homology with *L. plantarum* isolates, suggesting that the gene can be identified as *plnA* gene responsible for the antimicrobial activity.

**Keywords:** Antibacterial, *plnA* genes, passion fruit, *Lactobacillus plantarum*

## PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) sering digunakan untuk makanan dan pengawetan makanan misalnya untuk produksi produk fermentasi susu, keju, roti dan beberapa spesies juga digunakan sebagai protektif dalam industri daging (Vermeiren et al. 2004). Salah satu genus yang sering digunakan dari LAB adalah *Lactobacillus*. Keberadaan *Lactobacillus* di alam cukup beragam, dapat ditemukan pada tanaman, tanah, air, hewan, makanan dan saluran usus manusia. Bakteri *Lactobacillus plantarum* berbentuk batang dan tidak bergerak (non motil), bakteri ini

memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif anaerob, mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. Koloni *L. plantarum* dalam media agar berukuran 2-3 mm, berwarna putih. *L. plantarum* mempunyai kemampuan untuk menghambat mikroba patogen pada bahan pangan dengan daerah penghambatan terbesar dibandingkan dengan bakteri asam laktat lainnya (Fraizer dan Dennis, 1998).

Aktivitas antimikroba dari *Lactobacillus* terutama disebabkan oleh produksi asam laktat, asetat, format, kaproat, propionat, butirrat dan asam valerat (Corsetti et al.

1998). *Lactobacillus* juga menghasilkan zat penghambat lainnya seperti  $H_2O_2$  (Ito et al. 2003) serta bakteriosin yakni senyawa protein yang dihasilkan oleh bakteri yang memiliki aktivitas bakterisidal dan bakteriostatik (Ogunbanwo et al. 2003) selanjutnya Ammor et al. (2006) menambahkan bahwa bakteriosin merupakan senyawa termostabil dengan berat molekul rendah dan mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri Gram positif atau Gram negatif serta mempunyai efek terapeutik.

Bakteri Gram positif lainnya yang merupakan mikroba penyebab pembusukan dan patogen pada makanan yaitu *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* dan beberapa spesies *Bacillus*. *Bacillus cereus* bersifat aerob atau aerob fakultatif, motil, membentuk spora. Bakteri ini sering dikaitkan terutama dengan keracunan makanan, beberapa dilaporkan sebagai penyebab infeksi non gastrointestinal yang serius dan berpotensi fatal (Bottone 2010). Sel *Bacillus cereus* mempunyai ujung yang berbentuk empat persegi dan tersusun dalam rantai panjang. Spora biasanya terletak di tengah basil yang tidak bergerak dan resisten terhadap perubahan lingkungan seperti panas kering dan disinfektan kimia tertentu selama waktu yang cukup lama dan dapat bertahan selama bertahun-tahun dalam tanah kering dengan menggunakan sumber nitrogen dan karbon sederhana untuk energi dan pertumbuhannya (Johnson dan Arthur 1994), sedangkan *Escherichia*, adalah bakteri Gram negatif yang sebagian spesiesnya penyebab penyakit saluran pencernaan. *E. coli* ditemukan di danau, sungai dan laut, berasal dari tinja manusia dan hewan berdarah panas serta perairan yang terkontaminasi oleh limbah bersifat organik dan dalam usus manusia dan hewan. Beberapa galur merupakan patogen terhadap manusia dan hewan yang terlibat dalam penyakit menular melalui makanan (Ray 2004).

Sasaran bakteriosin umumnya mengganggu dinding sel atau membran dengan menghambat biosintesis dinding sel atau menyebabkan pembentukan pori sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Sullivan et al. 2002). Bakteriosin yang ditemukan pada bakteri probiotik *L. plantarum* adalah plantarisin. Berbagai jenis plantarisin yang diproduksi oleh *L. plantarum* diantaranya plantarisin (*pln*) *A<sub>pln</sub>* merupakan gen untuk regulasi produksi bakteriosin sedangkan gen plantarisin G, H, S, T, U, V merupakan gen yang terlibat dalam transportasi bakteriosin (Sturme et al. 2007; Rojo-Bezares et al. 2008; Diep et al. 2009; Sáenz et al. 2009). Plantarisin A merupakan salah satu jenis bakteriosin kelas II yang tahan terhadap panas. Gen *plnA* berfungsi sebagai penginduksinya yang bertanggung jawab untuk produksi plantarisin A serta transkripsi *plnBCD* yang merupakan satu operon dalam satu gen struktural. Plantarisin A mempunyai fungsi ganda yaitu sebagai faktor induksi dalam pengaturan gen dan sebagai peptida antimikroba (Diep et al. 2009). Struktur  $\alpha$  heliks gen *plnA* meliputi asam amino 12 sampai 21 (diduga termasuk juga asam amino 22 dan 23), merupakan pengenalan heliks yang dapat membuat kontak sehingga sekuens DNA dapat dibaca (Per et al. 2005).

Mengingat fungsinya yang penting, gen *plnA* telah dideteksi dari beberapa *L. plantarum* antara lain dari *L. plantarum* ST-III pada sayur kimchi (Wang et al. 2010) dan *L. plantarum* WCFS1 dari saliva manusia (Kleerebezem et al. 2003).

Beberapa isolat *L. plantarum* dari buah markisa indigenus Indonesia memiliki fungsi probiotik dapat berperan menurunkan kolesterol telah diisolasi dan dienkapsulasi (Nurhidayat et al. 2006). Gen *plnA* pada *L. plantarum* dari buah markisa belum pernah dideteksi selama ini. Penelitian ini akan mendeteksi gen *plnA* pada isolat *L. plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis* Sims) yang memiliki aktivitas hambat tertinggi terhadap bakteri uji *B. cereus* dan *E. coli*. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antibakteri dan mendeteksi gen *plnA* pada *L. plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis* Sims).

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi dan karakterisasi bakteri *Lactobacillus*

Isolasi *Lactobacillus* menggunakan media GYP (Glucose Yeast Peptone) dengan komposisi dalam 1 liter sebagai berikut : glukosa 10 g, yeast ekstrak 10 g, pepton 5 g, beef ekstrak 2 g, Na-acetat. $H_2O$  1,4 g, salt solution 5 ml (salt solution:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0,1 g;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g; NaCl 0,1 g;  $dH_2O$  50 mL) Tween 80 0,5 g, agar 20 g  $CaCO_3$  0,075 g/mL medium,  $dH_2O$  1 L. Media pemeliharaan isolat *Lactobacillus* adalah media MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar (Oxoid),

Sampel buah diambil sebanyak 1 g lalu dilakukan pengenceran sampai  $10^{-8}$  dengan larutan saline (0,85% NaCl) secara duplo, kemudian diinokulasikan pada media GYP dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Pertumbuhannya diamati, apabila pada media GYP terlihat zona jernih diduga bakteri asam laktat. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram dan uji katalase untuk mendapatkan bakteri *Lactobacillus*.

Pewarnaan Gram dilakukan menurut metode Harisha (2006) dan uji aktivitas katalase dengan menggunakan  $H_2O_2$  3%. Apabila diteteskan pada sel bakteri, reaksi katalase negatif apabila tidak adanya busa atau buih yang terjadi setelah penambahan larutan tersebut selama 1 menit.

### Preculture *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*

Bakteri uji yang digunakan adalah *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* merupakan koleksi Lab. Genetika Mikrobiologi LIPI. Preculture bakteri uji *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* menggunakan media LB (Luria Bertani) dengan komposisi Trypton (10,0 g), Ekstrak Yeast (5,0 g), NaCl (10 g), Agar (15 g) dalam 1 liter Akuades dan media EMB untuk *E. coli* (Pepton 10 g, laktosa 5 g, sukrosa 5 g), dikalium,  $PO_4$  2 g, agar 13,5 g, eosin y 0,4 g, methylene blue 0,065 g, dalam 1 liter Akuades, pH : 7,2). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam

### Uji aktivitas antibakteri *L. plantarum*

Metode yang digunakan adalah metode *Agar Well Diffusion Assay* (AWDA) (Gong 2010) yang dimodifikasi. Sepuluh isolat *Lactobacillus* yang telah diisolasi dari buah markisa yaitu isolat Mar A2, Mar A3, Mar A5, Mar A7, Mar B1, Mar B3, Mar B4, K Mar C7, Mar D2, dan Mar 8 ditumbuhkan pada media cair GYP selama 48 jam diinkubasi pada suhu 37°C. Kemudian

disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatnya ini berasal dari suspensi isolat *Lactobacillus* dengan jumlah  $10^8$  sel/mL. Supernatan disaring dengan menggunakan membran filter 0,2 mm sehingga menjadi supernatan yang bebas sel.

Sebanyak 100  $\mu$ L masing-masing kultur bakteri uji *E. coli* dan *B. cereus* yang kekeruhannya setara dengan  $10^6$  sel/ml disebar pada media GYP, lalu diratakan hingga terdispersi keseluruh permukaan. *Disc blank* steril direndam selama 5 menit di dalam supernatan *Lactobacillus* lalu diletakkan pada cawan yang telah berisi medium dan bakteri uji. Sebagai kontrol negatif digunakan akuades, sedangkan sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol lalu diinkubasi selama 48 jam suhu  $37^\circ\text{C}$ . Aktivitas hambatan supernatan terhadap pertumbuhan bakteri uji terbentuk zona bening disekitar paper disc. Diameter zona penghambatan yang tertinggi akan digunakan untuk mendeteksi gen *plnA*. Semakin luas zona inhibisi maka akan semakin besar aktivitas antibakterinya. Kemudian hasilnya dikoreksi dengan kontrol, yaitu ukuran kertas uji sebesar 0.6 cm.

$$\text{Diameter daerah hambat relative} = \frac{\text{hasil ddh (cm)} - 0,6 \text{ cm}}{0,6 \text{ cm}}$$

#### Ekstraksi DNA *Lactobacillus*

Isolat *Lactobacillus* ditumbuhkan pada media GYP cair sampai mencapai fase log pertumbuhan lalu diambil sebanyak 1 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 Rpm selama 2 menit. Pelet sel diambil dan ditambahkan 500  $\mu$ L EDTA 50 mM, pH 8,0 dan 100  $\mu$ L Lysozim 30 mg/ml, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 30-60 menit. Selanjutnya mengikuti prosedur dari Kit dengan merk dagang Promega. Pelet DNA kemudian dikeringkan dan dilarutkan bufer TE 100  $\mu$ L (Van Hijum et al. 2002).

Uji kuantitasi DNA hasil lisis dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang A260 dan A280 nm untuk mengetahui kemurnian DNA dan juga pengukuran konsentrasi DNA (Watson et al. 1987). Kemurnian DNA ditentukan dengan indeks kemurnian berkisar antara 1.8-2.0 (Sambrook dan Russell 2001).

Pengukuran serapan DNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm ( $A_{260}$ ). Pada  $A_{260} = 1$ , konsentrasi DNA adalah 50 mg/mL, pengenceran adalah  $10 \times$ . Penghitungan konsentrasi DNA sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA (mg/mL)} \times \text{Pengenceran} = A_{260} \times 50 \text{ mg/mL}$$

#### Analisis hasil isolasi DNA genom

Hasil isolasi DNA genom dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1% (b/v) Elektroforesis dilakukan selama 45 menit pada tegangan 100 Volt dengan TAE 1x sebagai *running buffer*. Hasil elektroforesis dilihat dengan transiluminator UV pada panjang gelombang 312 nm dan dicetak menggunakan *printgraph* (Van Hijum, 2002).

#### Amplifikasi gen *plantarisin*

Amplifikasi gen *Plantarisin* dibuat *mastermix* dalam volume total 50  $\mu$ L, masing-masing berisi 2  $\mu$ L DNA *template*, *takara ex Taq* (5 U/ $\mu$ L) 0, 15  $\mu$ L, *10 x ex taq*

*buffer* 5  $\mu$ L, 2,5 mM dNTP's 4  $\mu$ L, Primer yang digunakan adalah *Forward* (5'- GTA CAG TAC TAA TGG GAG -3') 2,5  $\mu$ L primer *forward* 1 mM dan primer *Reverse* (5'- CTT ACG CCA TCT ATA CG- 3') 2,5  $\mu$ L primer *reverse* 1 mM dan 33,85  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (Navarro et al. 1999).

Amplifikasi gen dilakukan dengandaturasi awal pada suhu  $94^\circ\text{C}$  selama 3 menit, diikuti dengan 30 siklus  $94^\circ\text{C}$  selama 30 detik, *annealing*  $53^\circ\text{C}$  selama 1 menit, dan suhu ekstensi  $72^\circ\text{C}$  selama 1 menit, diikuti dengan langkah ekstensi akhir pada suhu  $72^\circ\text{C}$  selama 6 menit (Poirel dan Nordmann 2006).

#### Deteksi hasil produk PCR

Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,2% (b/v) yang dibuat Pemisahan DNA pada alat elektroforesis dilakukan dengan mencampursebanyak 5  $\mu$ L produk hasil PCR dengan 1,00  $\mu$ L *loading dye*. Campuran dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,2% (b/v) (Yuwono 2006). Analisis ukuran DNA digunakan penanda DNA Geneaid 100 bp DNA Ladder yang mengandung 12 penanda ukuran pasang basa DNA dari 100 bp sampai dengan 3000 bp.

#### Sekuensing (penentuan urutan DNA)

Penentuan urutan DNA (sekuensing) produk PCR dilakukan menggunakan metoda *dideoxy Sanger* dengan *Dye terminator*. Salah satu isolat positif dari hasil PCR digunakan sebagai sampel untuk sekuensing DNA. Sekuensing dilakukan oleh 1st BASE Pte Ltd, 41 Science Park Road, The Gemini Singapore Science Park II, Singapura.

#### Analisis gen *plnA*

Analisis gen *plnA* dilakukan dengan menggunakan program *Blastn Suite*, Sekuen yang dihasilkan kemudian dianalisis homologinya dengan gen yang sama dari *L. plantarum* yang lain.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### Isolasi dan karakterisasi bakteri *Lactobacillus*

Dari hasil isolasi dan karakterisasi isolat dari buah markisa, koloni bakteri asam laktat ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloninya. Hal ini terjadi akibat produksi asam yang terdapat pada media selama pertumbuhan bakteri asam laktat yang dinetralkan oleh CaCO<sub>3</sub>. Diperoleh 10 isolat berbentuk batang (Rod) dan termasuk ke dalam bakteri Gram + (positif), reaksi katalase negatif tidak mengeluarkan buih setelah diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semua bakteri asam laktat (Tabel 1) merupakan biak *Lactobacillus*.

#### Uji aktivitas antibakteri *L. plantarum*

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri isolat *L. plantarum* yang telah diisolasi dari buah markisa terhadap bakteri uji *B. cereus* dari golongan bakteri Gram positif dan *E. coli* dari golongan bakteri Gram negatif terhadap sepuluh isolat *L. plantarum* ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Morfologi dan fisiologibakteri *Lactobacillus*

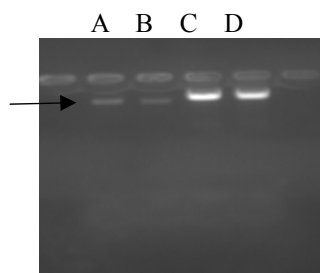
Kode biak	Asal	Gram	Bentuk sel	Reaksi katalase
Mar B4	Markisa	+	Rod	-
Mar A7	Markisa	+	Rod	-
Mar 8	Markisa	+	Rod	-
Mar A5	Markisa	+	Rod	-
Mar A2	Markisa	+	Rod	-
Mar B3	Markisa	+	Rod	-
KMar A7	Markisa	+	Rod	-
Mar A3	Markisa	+	Rod	-
Mar D2	Markisa	+	Rod	-
Mar B1	Markisa	+	Rod	-

**Tabel 2.** Zona hambat *L. plantarum* terhadap bakteri uji *B. cereus* dan *E. coli*.

Nama isolat	Diameter zona hambat terhadap bakteri uji (cm)	
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. plantarum</i> Mar B4	0,3	0,2
<i>L. plantarum</i> Mar A7	0,15	0,3
<i>L. plantarum</i> Mar 8	0,15	0,2
<i>L. plantarum</i> Mar A5	0,15	0,2
<i>L. plantarum</i> Mar A2	0,1	0,2
<i>L. plantarum</i> Mar B3	0,1	0,2
<i>L. plantarum</i> KMar C7	0	0
<i>L. plantarum</i> Mar A3	0	0
<i>L. plantarum</i> Mar D2	0	0
<i>L. plantarum</i> Mar B1	0	0
Kontrol +	2,7	0,7

**Tabel 3.** Konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi isolat *L. plantarum*.

Isolat bakteri	$\lambda 260$ nm	$\lambda 280$ nm	Rasio absorbansi ( $\lambda 260$ nm/ $\lambda 280$ nm)	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Mar 8	0,061	0,047	1,280	30,5
Mar A7	0,044	0,033	1,358	22,0
Mar A5	0,075	0,050	1,495	37,5
Mar B4	0,037	0,028	1,314	18,5

**Gambar 1.** Hasil *running* Elektroforesis DNA genom isolat *L. plantarum* terseleksi: A. DNA genom isolat Mar 8, B. Mar A7, C. Mar A5, D. Mar B4. Keempat isolat mempunyai DNA genom dengan ukuran yang sama ditunjukkan dengan posisi pita DNA keempatnya berada pada baris yang sejajar

Hasil pengukuran zona hambat terhadap *B. cereus* (Tabel 2.) terdapat 6 isolat *L. plantarum* yang memiliki daya hambat yaitu isolat Mar 8, Mar A7, Mar A5, Mar B4, Mar B3, dan Mar A2. Isolat yang tidak memiliki zona hambat yaitu *Lactobacillus* Mar A3, Mar D2, K mar C7, dan Mar B1 terhadap kedua bakteri uji.

Isolat *L. plantarum* Mar B4 memiliki zona hambat yang terbesar, sedangkan isolat *L. plantarum* B3 dan A2 memiliki zona hambat yang terendah. Daya hambat terhadap *E. coli* yang tertinggi adalah isolat MarA7. Isolat yang kurva pertumbuhannya lebih baik dan memiliki zona hambat yang lebih baik dibandingkan dengan isolat yang lain karena peluang mendapatkan gen *plnA* akan lebih tinggi dibandingkan dengan deteksi dari isolat yang tidak mempunyai zona hambat terhadap bakteri uji.

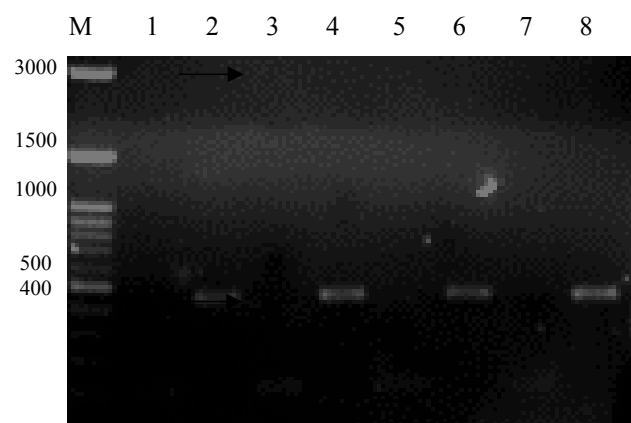
#### Isolasi DNA genom isolat *Lactobacillus* terseleksi

Kurva pertumbuhan *L. plantarum* Mar 8 dan Mar A7 berbeda dengan 4 isolat lainnya. Isolat Mar 8 dan Mar A7 pada inkubasi 24 jam sudah memiliki kekeruhan sel yang cukup untuk dilakukan isolasi DNA genom. Isolat Mar A5 dan Mar B4 membutuhkan waktu pertumbuhan selama 48 jam untuk mendapatkan kekeruhan sel yang cukup. Perbedaan waktu pertumbuhan menyebabkan isolasi DNA isolat Mar 8 dan Mar A7 dilakukan pada waktu yang berbeda dengan isolasi DNA isolat Mar A5 dan Mar B4.

Perbedaan ketebalan fragmen DNA pada kolom A dan B dengan kolom C dan D terjadi karena pengambilan sampel DNA yang kurang homogen menyebabkan DNA genom tidak tercampur secara merata pada larutan penyangga sehingga hasil elektroforesis terlihat pita tipis seperti jumlah DNA yang kurang/sedikit, padahal nilai konsentrasi DNA isolat *L. plantarum* Mar 8 dan Mar A7 (Tabel 3.) tidak berbeda jauh dengan isolat *L. plantarum* Mar A5 dan Mar B4. Nilai kemurnian dan konsentrasi DNA empat isolat *L. plantarum* ditunjukkan pada Tabel 3.

#### Amplifikasi gen *plnA*

Hasil PCR gen *plnA* ditunjukkan pada Gambar 2.

**Gambar 2.** Gen *plnA* isolat *L. plantarum* terseleksi 1. Marker Ladder 100 bp 2, 4, 6 dan 8. Isolat Mar 8, Mar A7, MarA5, dan Mar B4

**Tabel 4.** Hasil sekuensing produk PCR isolat *L. plantarum* Mar 8

5'CCTTTTTTTTT	TGCGCTCCCT	TAAGTTAATG	TTATTTTATC	CTCTAAGTAT	50
GTTCAAAGTA	ATCAAGATCT	ATTCAAAAATA	GTGACTTTGA	CATTCATCAA	100
ATATTGATTG	ATAGCATAGT	TGGAATTTCA	TGGTGATTCA	CGTTTAAATT	150
AAAAAAATGT	ACGTTAATAG	AAATAATTCC	TCCGTACTTC	AAAAACACAT	200
TATCCTAAAA	GCGAGGTGAT	TATTATGAAA	ATTCAAATTA	AAGGTATGAA	250
GCAACTTAGT	AATAAGGAAA	TGCAAAAAAT	AGTAGGTGGA	AAGAGTAGTG	300
CGTATTCTTT	GCAGATGGGG	GCAACTGCAA	TTAAACAGGT	AAAGAACTG	350
TTTAAAAAAT	GGGGATGGTA	ATTGATTTAT	TGAATAACTG	TTTTTTAAGT	400
TATATTCGT	ATAGATGGCG	TAAGACA3'			427

**Tabel 5.** Penjajaran beberapa gen yang paling homolog dengan hasil sekuensing produk PCR isolat *L. plantarum* Mar 8 di *Genebank* pada program distribusi *Blastn Suite*.

Deskripsi	Max ident
<i>L. plantarum</i> plnA gene for plantaricin A, partial cds	100%
<i>L. plantarum</i> plnA, B, C, D genes	99%
<i>L. plantarum</i> strain BFE5092 plantaricingene locus partial	99%
<i>L. plantarum</i> strain V90 pln gene locus, partial sequence	99%
<i>L. plantarum</i> WCFS1 complete genome	98%
<i>L. plantarum</i> subsp. Plantarum ST-III, complete genome	98%
<i>L. plantarum</i> pln locus, strain C11	98%
<i>L. plantarum</i> strain 8P-A3 plantaricin A precursor peptide	96%
<i>L. plantarum</i> strain J51 pln locus, partial sequence	95%

### Analisis gen *plnA*

Analisis gen *plnA* bertujuan untuk mengkonfirmasi produk PCR tersebut sesuai dengan lokus gen *plnA* kemudian disejajarkan homologinya dengan gen yang sama dari *L. plantarum* yang lain menggunakan program *Blastn Suite*. Produk PCR yang disekuensing adalah salah satu yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu isolat *L. plantarum* Mar 8 menggunakan primer untuk gen *pln A*. Hasil elektroforesis menunjukkan kesejajaran pita antara produk PCR Mar 8 dengan isolat Mar A7, Mar A5, dan Mar B4.

Jumlah basa DNA hasil sekuensing produk PCR isolat *L. plantarum* Mar 8 adalah 427 bp, hasil elektroforesis menunjukkan pita sejajar sekitar 400- 500 bp. Untuk menentukan keberhasilan deteksi gen *plnA* maka dilakukan penjajaran dari distribusi program *Blastn Suite* dari pusat data *Genebank*. Tabel 5. menunjukkan sembilan hasil tertinggi dari distribusi program *Blastn Suite*.

### Pembahasan

#### Uji aktivitas antibakteri *L. plantarum*

Empat isolat yang memiliki zona hambat terbesar yaitu isolat *L. plantarum* Mar B4, Mar A7, Mar 8 dan Mar A5. Diameter zona hambat yang terbentuk dapat berupa diameter zona bening di sekeliling sumur yang

menunjukkan sifat bakterisidal (membunuh bakteri) maupun diameter zona semu yang menunjukkan sifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikroba). Hal ini membuktikan bahwa *L. plantarum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri dari golongan Gram negatif yang sesuai dengan pernyataan Ogunbanwo et al. (2003) bahwa bakteriosin tidak saja menghambat spesies yang secara filogenik dekat tetapi juga mampu menghambat bakteri Gram negatif dan tergantung pada perbedaan jenis dinding sel bakteri yang dihambat, yang berpengaruh pada ketahanan suatu bakteri terhadap zat antimikroba, karena perbedaan struktur dinding selnya di samping itu jumlah biomassa *Lactobacillus* yang terlalu banyak akan menghasilkan akumulasi jumlah asam laktat yang berlebihan dan akan menurunkan nilai pH. Penurunan pH dapat mengganggu mikroba dalam biosintesis bakteriosin. Aktivitas bakteriosin dari golongan bakteri yang sama lebih baik dibandingkan dengan golongan yang berbeda. Sedangkan terhadap *B. cereus* yang termasuk Gram positif sangat sensitif terhadap senyawa antibakteri yang bersifat non polar. Plantaricin A merupakan senyawa yang bersifat non polar. Kesensitifan ini karena komponen dasar penyusun dinding sel bakteri Gram positif adalah peptidoglikan yang salah satu penyusunnya adalah asam amino D-alanin yang bersifat hidrofobik. Senyawa antibakteri yang bersifat non polar dapat bereaksi dengan

fosfolipid dari membran sel bakteri sehingga mengakibatkan lisis sel (Brannen dan Davidson 1993).

#### Isolasi DNA genom isolat *L. plantarum* terseleksi

Keberhasilan isolasi DNA genom *L. plantarum* merupakan tahap penting dari penelitian ini sebagai cetakan untuk proses PCR, karena *L. plantarum* adalah bakteri Gram positif yang mempunyai dinding sel tebal sehingga sukar untuk dilisis.

Kualitas DNA dapat dilihat dari nilai kemurnian dan konsentrasi DNA. Kemurnian DNA diukur berdasarkan perbandingan nilai rasio absorbansi (260 nm/280 nm) Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Sambrook dan Russell 2001), yang berada di atas kisaran DNA murni menunjukkan terkontaminasi RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan masih terkontaminasi protein.

Konsentrasi DNA diperlukan untuk mengetahui massa sel dalam µg/mL pada λ260 nm. Hasil pengukuran rasio absorbansi panjang gelombang (260 nm/280 nm) isolat *L. plantarum* Mar 8, Mar B4, Mar A7 dan Mar A5 terkontaminasi protein karena memiliki rasio dibawah 1,8, sehingga secara kualitas hasil isolasi DNA genom memiliki tingkat kemurnian yang kurang baik. Sambrook dan Russell (2001) menerangkan bahwa kualitas DNA cetakan yang baik bukan syarat mutlak dalam proses PCR, sehingga hasil isolasi DNA genom ini dapat digunakan untuk PCR. Konsentrasi DNA dari seluruh sampel yang dihitung memiliki konsentrasi yang cukup banyak.

#### Amplifikasi gen *plnA*

Pada Gambar 2. menunjukkan proses PCR berjalan dengan sempurna dimana pita fragmen DNA yang dihasilkan tebal. Reaksi PCR pada kolom 2,4,6 dan 8 adalah keempat isolat yang menggunakan primer *pln A* dengan suhu *annealing* yang telah digradien sebelumnya oleh Navarro et al. (2000) pada suhu 53°C, sehingga pada hasil *running* gel elektroforesis menunjukkan pita tebal pada ukuran sekitar 400- 500 bp. Sambrook dan Russell (2001) menyatakan bahwa suhu denaturasi awal, *annealing*, polimerasi awal, dan polimerase akhir yang tepat dapat meminimalkan perlekatan primer pada sekuen non spesifik dan meningkatkan jumlah produk PCR spesifik, walaupun demikian proses PCR telah berhasil dilakukan dengan primer yang digunakan, karena proses PCR mengamplifikasi daerah yang sama pada semua sampel dan menghasilkan pita yang tunggal.

Wilson (1994) menyatakan bahwa suatu sampel DNA dikatakan spesifik dan berhasil diamplifikasi apabila hasil analisis elektroforesis menunjukkan terdapatnya pita tunggal DNA dengan ukuran yang sesuai berdasarkan penanda yang telah diketahui sebelumnya. Elektroforesis gel menunjukkan bahwa produk PCR untuk amplifikasi gen *plnA* ini mencakup lokus gen *plnA*, *plnB*, *plnC* dan *plnD*.

#### Analisis gen *plnA*

Hasil *alignment* didapatkan sembilan sekuen yang signifikan berdasarkan nilai *max ident* untuk menentukan homologi. Hasil *alignment* yang dilakukan penjabaran dengan hasil sekuensing produk PCR isolat *L. plantarum*

Mar 8 yang dapat digunakan untuk membuktikan berhasil atau tidaknya deteksi gen *plnA L. plantarum* dari buah markisa. Pertama adalah gen *plnA L. plantarum* untuk *plantaricinA*, *partial cds* yang dijabarkan dengan hasil sekuensing menunjukkan homologi dengan gen *plnA* yaitu dengan kesamaan (*max ident*) 100%. Kesamaan tersebut ditunjukkan dari basa nitrogen pada pasang basa nomor 245 sampai dengan pasang basa nomor 372 hasil sekuensing dengan gen *plnA* dari *L. plantarum* pada pasang basa pertama sampai pasang basa 147 (Tabel 6).

Kesamaan sebesar 100% menunjukkan sekuen dari produk PCR isolat *L. plantarum* Mar 8 memiliki lokus gen *plnA*. Suatu sekuen DNA dinilai memiliki homologi tinggi dengan sekuen DNA lain apabila memiliki nilai kesamaan yang tinggi (Claverie dan Notredame 2003).

Penjabaran kedua adalah antara hasil sekuensing dengan *L. plantarum pln A, B, C, dan D* genes. Tabel 7. menunjukkan bahwa hasil sekuensing produk PCR isolat *L. plantarum* Mar 8 memiliki kesamaan sebesar 99% dengan lokus gen *plnA*, *plnB*, *plnC* dan *plnD*. Kesamaan ditunjukkan pada pasang basa nomor 8 sampai dengan pasang basa nomor 424 hasil sekuensing dengan pasang basa pada nomor 333 sampai dengan pasang basa nomor 750 pada lokus gen *plnA*, *plnB*, *plnC* dan *plnD*.

Penjabaran dari dua hasil program distribusi *Blastn Suite* dengan hasil sekuensing ini menunjukkan bahwa deteksi gen *plnA L. plantarum* terseleksi dari buah markisa berhasil dilakukan dalam penelitian ini. Nilai kesamaan diantara 95%- 100% dengan Sembilan isolat *L. plantarum* yang ada di *Genebank* juga membuktikan bahwa empat isolat yang diuji benar-benar merupakan isolat *L. plantarum* yaitu isolat Mar B4, Mar A7, Mar 8 dan Mar A5.

Keberadaan gen *plnA* pada *L. plantarum* membuktikan bahwa *L. plantarum* terseleksi dari buah markisa mempunyai kemampuan menghasilkan plantarisin A sebagai mekanisme pertahanan terhadap bakteri lain berdasarkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 400-500 bp. Hasil sekuensing dan penjabaran gen *plnA L. plantarum* Mar 8 dari buah markisa (*Passiflora edulis* Sims) menunjukkan kesamaan 99% dengan gen *plnA* dari *Genebank*.

Bakteriosin plantarisin A umumnya diproduksi pada awal fase log. Hal ini tentu saja membutuhkan faktor nutrisi yang cukup dalam medium yang diperoleh dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam buah markisa. Buah markisa yang mengandung bakteri *L. plantarum* secara tidak langsung dapat dijadikan alternatif pemanfaatan buah markisa untuk kesehatan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh kegiatan Kompetitif Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Kami sampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Puslit Biologi LIPI. Tak lupa ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada Ernawati Kasim, Christian Parlindungan, Ratih dan Acun yang turut serta dalam penelitian ini.

**Tabel 6.** Penjajaran hasil sekuensing dengan *Lactobacillus plantarum* plnA gene for plantaricinA, partial cds

<i>Lactobacillus plantarum</i> plnA gene for plantaricin A, partial cds			
Score = 267 bits, Expect = 2e-71			
Identities = 147/147 (100%), Gaps = 0/147 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
Query	225	ATGAAAATTCAAATTAAGGTATGAAGCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAAAAATAGTA	284
Sbjct	1	ATGAAAATTCAAATTAAGGTATGAAGCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAAAAATAGTA	60
Query	285	GGTGGAAAGAGTAGTGCGTATTCTTTGCAGATGGGGGCAACTGCAATTAACAGGTAAAG	344
Sbjct	61	GGTGGAAAGAGTAGTGCGTATTCTTTGCAGATGGGGGCAACTGCAATTAACAGGTAAAG	120
Query	345	AAACTGTTTAAAAAATGGGGATGGTAA	372
Sbjct	121	AAACTGTTTAAAAAATGGGGATGGTAA	147

**Tabel 7.** Penjajaran hasil sekuensing dengan *Lactobacillus plantarum* pln A, B,C,dan D genes.

<i>L. plantarum</i> pln A, B, C and D genes			
Score = 743 bits (402), Expect = 0.0			
Identities = 413/418 (99%), Gaps = 1/418 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
Query	8	ttttGCGCT-CCCTTAAGTTAATGTTATTTATCCTCTAAGTATGTTCAAAGTAATCAAG	66
Sbjct	333	TTTAGCGCTACACTTAAGTTAATGTTATTTATCCTCTAAGTATGTTCAAAGTAATCAAG	392
Query	67	ATCTATTCAAAATAGTGACTTTGACATTCATCAAATATTGATTGATAGCATAGTTGGAAT	126
Sbjct	393	ATCTATTCAAAATAGTGACTTTGACATTCATCAAATATTGATTGATAGCATAGTTGGAAT	452
Query	127	TTTCAATGGTATTACGTTTAAATTAaaaaaaTGTACGTTAATAGAAAATAATTCCCTCCGTA	186
Sbjct	453	TTTCAATGGTATTACGTTTAAATTTAAAAAATGTTACGTTAATAGAAAATAATTCCCTCCGTA	512
Query	187	CTTCAAAAACACATTATCCTAAAAGCGAGGTGATTATTATGAAAATTCAAATTAAGGTA	246
Sbjct	513	CTTCAAAAACACATTATCCTAAAAGCGAGGTGATTATTATGAAAATTCAAATTAAGGTA	572
Query	247	TGAAGCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAAAAATAGTAGGTGGAAAGAGTAGTGCGTATT	306
Sbjct	573	TGAAGCAACTTAGTAATAAGGAAATGCAAAAAATAGTAGGTGGAAAGAGTAGTGCGTATT	632
Query	307	CTTTGCAGATGGGGGCAACTGCAATTAACAGGTAAAGAACTGTTTAAAAAATGGGGAT	366
Sbjct	633	CTTTGCAGATGGGGGCAACTGCAATTAACAGGTAAAGAACTGTTTAAAAAATGGGGAT	692
Query	367	GGTAATTGATTTATTGAATAACTGTTTTTAAAGTTATATTTTCGTATAGATGGCGTAAAG	424
Sbjct	693	GGTAATTGATTTATTGAATAACTGTTTTTCAAGTTATATTTTCGTATAGATGGCGTAAAG	750

## DAFTAR PUSTAKA

- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454-461]
- Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 23 (2): 382-398.
- Branen AL. 1993. Introduction to use of antimicrobials. In: Davidson, P.M, Branen AL (eds). *Antimicrobials in Food*. 2nd ed, Revised and Expanded. Marcell Dekker, New York.
- Corsetti A, Gobetti M, Rossi J, Daminiani P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of mix- ture of organic acids by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 253-256
- Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C, Nes IF. 2009. An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30:1562-1574
- Frazier WB, Dennis W. 1998. *Food Microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Gong HS, Meng XC, Wang H. 2010. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Control* 21: 89-96.
- Harisha S. 2006. *An Introduction to Practical Biotechnology*. Laxmi Publications. New Delhi.
- Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Toba T. 2003. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr Microbiol* 47: 231-236
- Johnson AG. 1994. *Mikrobiologi dan Imunologi*, 9899, Binarupa Aksara, Jakarta
- Kleerebezem MJ, Richard K, Douwe M, Oscar PK. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. North California State University, Raleigh, NC
- Nurhidayat N, Heni RS, Betty LJ, Caecilia N. 2006. Ketahanan dan Viabilitas *Lactobacillus plantarum* yang Dienkapsulasi dengan Susu Skim dan Gum Arab Setelah Pengeringan dan Penyimpanan. *LIPI*. Bogor.

- Ogunbanwo S, Sanni A, Onilude A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocins by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr J Biotechnol* 2 (7): 179-184.
- Per EK, Gunnar F, Dimitris M, Meyer JN. 2005. Structure and Mode of Action of the Membrane- Permeabilizing Antimicrobial Peptide Pheromone Plantaricin A. Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, Norway.
- Poirel LNT, Nordmann F. 2006. Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended-spectrum lactamases. *J Clin Microbiol* 44 (8): 3008-11
- Ray B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. CRC Press, New York.
- Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L, Jiménez-Días R, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2008. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape origin. *Arch Microbiol* 189: 491-499
- Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Navarro L, Díez L, Somalo S, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2009. Genetic diversity of the pln locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Intl J Microbiol* 134: 176-183.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold-Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sturme MHJ, Francke C, Sizen RJ, de Vos W, Kleerebezem M. 2007. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* 153: 3939-3947
- Sullivan LO, Ross RP, Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochemie* 84 (5-6): 593-604
- Van Hijum SAFT, van GS, Rahaoui H, Van DM, Dijkhuizen L. 2002. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 68 (9): 4390-4398.
- Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the bio- preservation of cooked meat products. *Int J Food Microbiol* 96: 149-164
- Wang Y, Chen. C, Ai. L, Zhou. F. 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ST-III. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy & Food Co, Ltd, 228 Jiangchangs Road, Shanghai 200436, China.
- Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. 1988. *DNA Rekombinan*. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Wilson K. 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel PM, Brent R, Kingston RE, Moore DO, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds). *Current Protocol in Molecular Biology*. Vol. I. John Wiley & Sons, New York.
- Yuwono T. 2005. *Biologi Molekular*. Penerbit Erlangga, Jakarta.