

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tempe

Tempe merupakan produk pangan fermentasi tradisional asli Indonesia yang telah dikenal sejak lama, terutama dalam budaya masyarakat Jawa. Tempe dibuat melalui proses fermentasi biji kedelai menggunakan kapang *Rhizopus* spp., terutama *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*, yang menghasilkan tekstur padat berwarna putih dengan cita rasa khas. Sebagai pangan tradisional, tempe memiliki peran penting dalam pola konsumsi masyarakat karena harganya terjangkau, mudah diperoleh, serta memiliki nilai gizi yang tinggi (Asbur & Khairunnisyah, 2021). Selain itu, tempe juga telah berkembang secara global dan dikenal sebagai produk pangan fermentasi fungsional yang berpotensi mendukung kesehatan (Romulo & Surya, 2021).

Secara gizi, tempe merupakan sumber protein nabati berkualitas tinggi yang mengandung asam amino esensial lengkap serta mudah dicerna akibat proses fermentasi. Dalam 100 gram tempe terkandung protein sekitar 20-46 gram, lemak, karbohidrat, serta berbagai mineral seperti kalsium, fosfor, zat besi, magnesium, dan seng, serta vitamin B kompleks termasuk vitamin B12 yang terbentuk selama fermentasi. Tempe juga kaya akan serat pangan dan senyawa bioaktif, khususnya isoflavon dalam bentuk aglikon, yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan isoflavon pada kedelai mentah (Asbur & Khairunnisyah, 2021).

Proses fermentasi kedelai menjadi tempe menyebabkan terjadinya perubahan komponen kimia dan peningkatan ketersediaan zat gizi. Kapang *Rhizopus* menghasilkan berbagai enzim hidrolitik seperti protease, lipase, dan amilase yang

menguraikan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana sehingga meningkatkan daya cerna protein dan bioavailabilitas mineral. Selain itu, fermentasi juga menurunkan kandungan senyawa antinutrisi seperti asam fitat dan tripsin inhibitor, sehingga tempe lebih aman dan bermanfaat bagi kesehatan dibandingkan kedelai mentah (Asbur & Khairunnisyah, 2021).

Dalam proses produksinya, pembuatan tempe meliputi tahapan sortasi kedelai, perendaman, perebusan, pengupasan kulit, inokulasi ragi tempe, pengemasan, dan fermentasi selama 36-48 jam pada suhu optimum. Tahapan perendaman dan fermentasi memungkinkan pertumbuhan bakteri asam laktat yang menurunkan pH dan menghambat bakteri patogen, sementara kapang tempe berperan utama dalam pembentukan tekstur dan senyawa bioaktif. Namun, proses produksi tempe juga menghasilkan limbah, terutama limbah cair yang mengandung bahan organik tinggi berupa protein terlarut, karbohidrat, lemak, dan mineral, yang berpotensi dimanfaatkan lebih lanjut sebagai sumber mikroorganisme fungsional (Romulo & Surya, 2021).

B. Limbah Tempe

Limbah tempe merupakan sisa hasil produksi tempe dalam bentuk limbah padat maupun limbah cair. Limbah padat berasal dari ampas kedelai yang tersisa setelah proses fermentasi. Limbah cair berasal dari air yang digunakan untuk pencucian, perendaman, dan perebusan kedelai selama proses produksi tempe (Sari & Rahmawati, 2020). Secara alami di lingkungan, jika limbah cair tempe yang kaya organik ini terakumulasi dalam kondisi tanpa oksigen (anaerob), maka akan mengalami proses penguraian biologis yang kompleks. Proses penguraian anaerob ini umumnya berlangsung melalui beberapa tahapan berurutan, yaitu hidrolisis

(pemecahan senyawa kompleks menjadi sederhana), asidogenesis (pembentukan asam organik), dan metanogenesis (pengubahan asam menjadi metana dan CO₂) (Pujiana, 2015).

Limbah padat tempe umumnya dijual dan diolah menjadi tempe gembus atau pakan ternak, sedangkan limbah cair tempe biasanya langsung dibuang ke saluran pembuangan atau langsung ke badan air seperti sungai tanpa pengolahan yang memadai. Kondisi tersebut dapat menurunkan kualitas perairan, antara lain dengan menimbulkan bau tidak sedap pada sungai maupun lingkungan di sekitar lokasi pembuangan limbah. Pencemaran akibat limbah cair tempe dapat menyebabkan penurunan kualitas air karena kandungan bahan organik yang tinggi, seperti BOD dan COD, yang dapat mengurangi daya dukung lingkungan dan mengganggu kehidupan organisme air. Selain itu, limbah cair tempe yang mengandung gas seperti H₂S, NH₃, dan CH₄ dari dekomposisi bahan organik dapat menyebabkan pencemaran udara dan pencemaran air yang berbahaya bagi ekosistem dan kesehatan manusia (Sayow dkk., 2020).

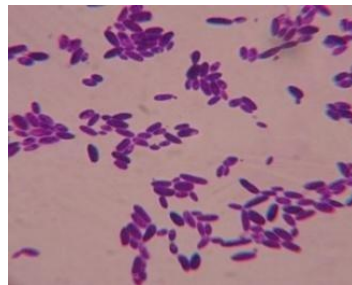
Meskipun menimbulkan dampak negatif, limbah cair tempe juga dapat memberikan dampak positif bila dikelola dengan baik dan dimanfaatkan potensinya. Pengolahan yang tepat dengan pendekatan *biorefinery* atau *waste-to-resource* dapat mengubah alur limbah dari beban lingkungan menjadi produk baru (Sari & Rahmawati, 2020). Limbah cair tempe mengandung bahan organik seperti protein, karbohidrat, lemak, dan minyak. Protein merupakan komponen yang paling dominan, dengan jumlah mencapai 40% - 60%, diikuti oleh karbohidrat 25% - 50%, dan lemak sekitar 10% (Sayow dkk., 2020). Kandungan nutrisi yang tinggi

berpotensi untuk dikembangkan, salah satunya sebagai sumber isolat mikroorganisme, seperti bakteri asam laktat (Sari & Rahmawati, 2020).

C. Bakteri Asam Laktat

1. Karakteristik bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri heterogen yang berperan penting dalam proses fermentasi pangan serta dikenal memiliki potensi sebagai sumber antibakteri alami. Secara umum, BAL memiliki karakteristik sel berbentuk batang atau kokus, bersifat Gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora dan bersifat anaerob fakultatif (Mokoena & Omatola, 2021). Kemampuan BAL untuk tumbuh dan beradaptasi pada berbagai substrat, khususnya lingkungan yang kaya nutrisi, menjadikannya banyak ditemukan pada berbagai produk fermentasi serta berpotensi sebagai agen penghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen.



Gambar 1 Morfologi Bakteri Asam Laktat

(Sumber Prawan dan Bhima, 2017)

BAL umumnya bersifat mesofilik hingga termofilik dan mampu tumbuh pada kisaran suhu yang cukup luas, yaitu sekitar 5-45°C. Sebagian besar BAL menunjukkan pertumbuhan optimum pada suhu 25-37°C, meskipun beberapa strain tertentu mampu bertahan dan tumbuh pada suhu rendah (4-5°C) maupun suhu tinggi hingga 45°C, tergantung pada spesies dan adaptasi lingkungannya (Hao *et al.*,

2021). Selain toleransi suhu, BAL juga memiliki kemampuan bertahan pada rentang pH yang relatif luas, mulai dari kondisi asam hingga netral atau sedikit basa. BAL dapat bertahan dan tumbuh pada pH rendah sekitar 3,5-4,0 hingga pH netral atau sedikit basa (hingga pH 8-9), meskipun pertumbuhan optimal biasanya pada pH 5,5-7,0. Toleransi terhadap pH sangat bervariasi antar spesies dan strain, seperti *Lactobacillus plantarum* yang tumbuh optimal pada pH 6,0, *Leuconostoc mesenteroides* pada pH 4,5, dan *Streptococcus infantarius* pada pH 5,5 (Vera-peña *et al.*, 2020).

Dalam aktivitas metabolismenya, BAL mampu memproduksi asam laktat secara cepat selama proses fermentasi, yang menyebabkan penurunan pH lingkungan hingga di bawah 4,0 dalam waktu sekitar 16-24 jam (Hu *et al.*, 2022). Kondisi asam yang dihasilkan tersebut berperan penting dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan pembusuk, sehingga meningkatkan keamanan dan kualitas produk fermentasi. Selain asam laktat, BAL juga diketahui menghasilkan senyawa antimikroba lain, seperti asam asetat dan bakteriosin, yang semakin memperkuat aktivitas penghambatan terhadap mikroba lain.

2. Klasifikasi bakteri asam laktat

Klasifikasi awal bakteri asam laktat disusun berdasarkan pendekatan taksonomi konvensional yang mengandalkan karakter fenotipik. Dalam sistem ini, sebagian besar bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam genus besar *Lactobacillus* bersama dengan beberapa genus lain seperti *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Namun, pendekatan taksonomi konvensional yang hanya mengandalkan sifat fenotipik dinilai tidak lagi mencerminkan hubungan evolusioner yang sebenarnya. Oleh karena itu, dilakukan analisis

filogenetik berbasis sekuens genom utuh yang menunjukkan bahwa genus *Lactobacillus* bersifat sangat heterogen dan mencakup spesies dengan perbedaan genetik serta ekologis yang signifikan (Zheng *et al.*, 2020).

Berdasarkan hasil analisis filogenomik, genus *Lactobacillus* direklasifikasi menjadi 25 genera yang masih berada dalam famili *Lactobacillaceae*. Reorganisasi ini dilakukan karena spesies-spesies dalam genus *Lactobacillus* sebelumnya menunjukkan perbedaan genetik dan hubungan evolusioner yang cukup besar. Beberapa genera baru yang diperkenalkan antara lain *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, dan *Companilactobacillus*. Perubahan klasifikasi ini bertujuan untuk menyesuaikan pengelompokan bakteri asam laktat dengan kedekatan evolusioner dan karakter genom masing-masing spesies, sehingga dapat digunakan sebagai dasar yang lebih akurat dalam penelitian mikrobiologi dan penerapannya di bidang pangan serta industri (Zheng *et al.*, 2020).

3. Faktor pertumbuhan bakteri asam laktat

Pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dan kondisi lingkungan. Pemahaman terhadap faktor-faktor tersebut sangat penting dalam upaya mengoptimalkan proses fermentasi serta meningkatkan produksi metabolit, seperti asam laktat dan bakteriosin. Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan BAL meliputi faktor nutrisi, kadar garam, serta faktor lingkungan seperti pH dan suhu lingkungan (Chowdury, Nahar & Deb, 2020).

a. Faktor nutrisi

Sumber karbon merupakan komponen utama yang mendukung pertumbuhan BAL. Beberapa jenis karbohidrat, seperti glukosa, laktosa, sukrosa, fruktosa, dan

galaktosa, dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi, meskipun efektivitas penggunaannya berbeda antar spesies dan strain. Sebagian strain BAL dilaporkan tumbuh lebih optimal pada fruktosa atau sukrosa dibandingkan glukosa (Zheng *et al.*, 2024). Selain karbon, sumber nitrogen juga berperan penting dalam mendukung pertumbuhan sel dan produksi metabolit. Sumber nitrogen seperti pepton, ekstrak ragi, kasein, serta bahan nabati seperti kedelai dan gandum diketahui mampu meningkatkan biomassa dan aktivitas antimikroba BAL (Zheng *et al.*, 2024). Selain itu, mineral seperti magnesium, mangan, dan fosfat berperan sebagai kofaktor enzim yang mendukung aktivitas metabolik dan pertumbuhan sel (Kieliszek & Pobiega, 2021).

b. Pengaruh kadar garam

Kadar garam (NaCl) merupakan faktor penting dalam pertumbuhan BAL, khususnya pada fermentasi pangan. Konsentrasi garam rendah hingga sedang, yaitu sekitar 1-2%, umumnya masih mendukung pertumbuhan BAL. Sebaliknya, konsentrasi garam yang tinggi (>3%) dapat menghambat pertumbuhan secara signifikan, bahkan menurunkan aktivitas metabolik hingga lebih dari 60% (Ndiaye, Fliss & Filteau, 2024). Beberapa strain BAL memiliki kemampuan beradaptasi pada lingkungan dengan kadar garam tinggi, meskipun secara umum peningkatan konsentrasi garam cenderung menurunkan laju pertumbuhan dan produksi metabolit. Studi fermentasi kimchi menunjukkan bahwa penurunan kadar garam dari 2,5% menjadi 1% tidak menghambat pertumbuhan BAL maupun memperlambat proses fermentasi (Choi, Yang & Yoon, 2021).

c. Faktor lingkungan

Selain nutrisi, faktor lingkungan seperti pH dan suhu turut menentukan pertumbuhan BAL. BAL umumnya menunjukkan pertumbuhan optimal pada pH 5,5-7,0, meskipun toleransi terhadap pH dapat bervariasi antar spesies dan strain. Nilai pH yang terlalu rendah ($<5,0$) umumnya dapat menekan laju pertumbuhan sel. Suhu juga berpengaruh terhadap aktivitas metabolik BAL. Sebagian besar BAL tumbuh optimal pada suhu $25-37^{\circ}\text{C}$, namun beberapa strain tertentu mampu tumbuh pada kisaran suhu yang lebih luas, yaitu antara $5-45^{\circ}\text{C}$, tergantung pada karakteristik fisiologis dan adaptasi lingkungannya (Yang *et al.*, 2018).

4. Manfaat bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat dikenal sebagai bakteri yang menguntungkan karena memberikan berbagai manfaat dan aman untuk diaplikasikan dalam pangan. Mikroorganisme ini tidak menghasilkan senyawa toksik atau berbahaya sehingga tergolong sebagai *food grade microorganism* dan termasuk dalam kategori *Generally Recognized as Safe* (GRAS), yang menunjukkan bahwa penggunaannya dalam produk pangan dinilai aman dan tidak menimbulkan risiko bagi kesehatan manusia (Nova & Wardi, 2024).

a. Manfaat BAL di bidang pangan

Bakteri asam laktat memiliki peran fundamental dalam fermentasi pangan, khususnya pada produk susu dan pangan fermentasi tradisional. BAL mampu memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat yang menyebabkan penurunan pH lingkungan, sehingga menciptakan kondisi yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan mikroorganisme patogen. Selain asam organik, BAL juga menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin yang berperan dalam

menghambat bakteri patogen, termasuk bakteri penyebab kerusakan pangan. Kombinasi aktivitas tersebut menjadikan BAL sebagai agen biopreservasi alami yang berkontribusi terhadap peningkatan keamanan dan stabilitas mikrobiologis produk pangan fermentasi (Ayivi *et al.*, 2020). Selain meningkatkan keamanan pangan, aktivitas fermentatif BAL juga berpengaruh terhadap mutu sensori produk. Proses fermentasi menghasilkan senyawa volatil dan metabolit sekunder yang berkontribusi pada pembentukan aroma, rasa, dan tekstur khas produk fermentasi. Oleh karena itu, BAL banyak dimanfaatkan sebagai starter culture dalam industri pangan untuk menghasilkan produk yang konsisten, aman, dan memiliki kualitas organoleptik yang baik (Ayivi *et al.*, 2020).

b. Manfaat BAL terhadap kesehatan saluran pencernaan

BAL berperan penting dalam menjaga keseimbangan mikrobiota usus melalui mekanisme kompetisi nutrisi dan ruang dengan mikroorganisme patogen. Konsumsi BAL maupun produk fermentasinya dapat mendukung kolonisasi mikroba menguntungkan di saluran cerna, sehingga membantu mempertahankan integritas barrier usus. Selain itu, BAL menghasilkan enzim dan metabolit yang berkontribusi dalam peningkatan pencernaan dan penyerapan zat gizi, termasuk pemecahan karbohidrat kompleks dan protein. Peran ini menjadikan BAL sebagai komponen penting dalam pemeliharaan kesehatan gastrointestinal (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

c. Manfaat BAL di bidang imunologi

Dalam konteks imunologi, BAL dan fermentatnya diketahui memiliki aktivitas imunomodulator. Interaksi BAL dengan sel epitel dan jaringan limfoid usus dapat memengaruhi respon imun bawaan dan adaptif, termasuk regulasi produksi sitokin

dan peningkatan imunoglobulin mukosa. Efek ini berkontribusi terhadap peningkatan pertahanan tubuh terhadap infeksi serta pengendalian respon inflamasi yang berlebihan. Beberapa studi yang dirangkum dalam jurnal *Nutrients* juga menunjukkan bahwa fermentat BAL dapat memberikan efek imunologis meskipun sel bakteri tidak lagi hidup, sehingga memperluas potensi pemanfaatannya dalam produk pangan fungsional (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

d. Manfaat BAL dalam gangguan metabolik

BAL dilaporkan memiliki peran dalam mendukung kesehatan metabolik melalui pengaruhnya terhadap metabolisme lipid dan glukosa. Aktivitas BAL dapat membantu menurunkan kadar kolesterol dengan mekanisme pengikatan kolesterol di saluran cerna serta memengaruhi metabolisme asam empedu. Selain itu, keseimbangan mikrobiota usus yang dipengaruhi oleh BAL berkontribusi terhadap regulasi metabolisme energi. Oleh karena itu, konsumsi BAL secara teratur berpotensi mendukung pencegahan gangguan metabolik seperti obesitas dan diabetes melitus tipe 2 (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

e. Manfaat BAL dalam keamanan dan aplikasi industri

Pemanfaatan BAL dalam industri pangan juga berkontribusi terhadap pengurangan penggunaan bahan pengawet kimia, sejalan dengan peningkatan permintaan konsumen terhadap produk pangan alami dan aman. Selain itu, BAL berperan dalam alleviasi intoleransi laktosa karena kemampuannya memecah laktosa selama proses fermentasi, sehingga produk susu fermentasi lebih mudah dicerna oleh individu dengan defisiensi laktase. Manfaat ini menjadikan BAL tidak hanya relevan dalam industri pangan, tetapi juga memiliki dampak positif terhadap kesehatan masyarakat secara luas (Ayivi *et al.*, 2020).

f. Potensi BAL sebagai agen antikanker

Bakteri asam laktat memiliki potensi sebagai agen pendukung dalam pencegahan kanker melalui berbagai mekanisme biologis tidak langsung. Aktivitas fermentatif bakteri asam laktat menghasilkan metabolit bioaktif yang dapat memengaruhi lingkungan mikrobiologis saluran cerna, sehingga berkontribusi dalam menurunkan pembentukan senyawa karsinogenik. Selain itu, metabolit hasil fermentasi tersebut diketahui mampu mengurangi stres oksidatif dan mengendalikan respon inflamasi kronis, dua faktor yang berperan penting dalam proses karsinogenesis (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

Potensi antikanker bakteri asam laktat juga berkaitan dengan kemampuannya dalam memodulasi mikrobiota usus dan memperkuat fungsi barrier intestinal. Keseimbangan mikrobiota yang terjaga dapat menurunkan paparan mukosa usus terhadap zat berbahaya dan toksin, sehingga berpotensi mengurangi risiko perkembangan kanker, khususnya pada saluran pencernaan. Selain itu, peningkatan integritas barrier usus berperan dalam mencegah translokasi senyawa proinflamasi yang dapat memicu perubahan seluler abnormal (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

Beberapa metabolit dan fermentat bakteri asam laktat dilaporkan mampu menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis melalui mekanisme molekuler tertentu. Aktivitas ini menunjukkan bahwa bakteri asam laktat tidak hanya berperan dalam menjaga kesehatan usus, tetapi juga memiliki potensi dalam mendukung mekanisme pengawasan imun terhadap sel abnormal. Meskipun demikian, potensi antikanker bakteri asam laktat masih bersifat preventif dan

pendukung, serta belum dapat dikategorikan sebagai terapi utama kanker (Mathur, Beresford & Cotter, 2020).

D. Identifikasi Fenotipik Bakteri Asam Laktat

Identifikasi fenotipik bakteri asam laktat merupakan tahap awal dalam penelitian mikrobiologi yang bertujuan untuk mengetahui karakteristik dasar isolat yang diperoleh. Pendekatan ini dilakukan melalui pengamatan morfologi dan uji biokimia, seperti uji katalase, uji pewarnaan Gram, dan uji endospora. Hasil dari identifikasi fenotipik memberikan gambaran awal mengenai kemungkinan bahwa isolat yang diperoleh termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat.

1. Isolasi pada media MRS Agar

Media *De Man Ragosa and Sharpe Agar* (MRS Agar) merupakan media selektif yang secara luas digunakan untuk isolasi dan pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dari berbagai sumber pangan fermentasi. Media ini dirancang khusus untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat karena mengandung komponen nutrisi seperti glukosa sebagai sumber energi, pepton dan ekstrak ragi sebagai sumber nitrogen, serta garam mineral dan buffer yang mampu mempertahankan kondisi lingkungan yang sesuai bagi pertumbuhan BAL (Stephen & Saleh, 2023; Mohammed *et al.*, 2024).

Selain itu, keberadaan natrium asetat dan amonium sitrat dalam MRS Agar berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri non-bakteri asam laktat, sehingga media ini bersifat selektif dan banyak digunakan dalam penelitian mikrobiologi pangan untuk tahap awal seleksi isolat BAL (Stephen & Saleh, 2023). Penggunaan MRS Agar dalam proses isolasi bertujuan untuk memperoleh koloni

bakteri yang secara fisiologis dan nutrisi sesuai dengan karakteristik bakteri asam laktat sebelum dilakukan pengujian lanjutan (Mohammed *et al.*, 2024).

Isolat bakteri asam laktat yang berhasil tumbuh pada media MRS Agar umumnya menunjukkan karakteristik morfologi koloni yang khas. Koloni BAL pada media ini biasanya berwarna putih susu hingga krem, berbentuk bulat (*circular*), memiliki tepi koloni yang rata (*entire*), permukaan koloni halus dan mengkilap, serta elevasi koloni cembung (*convex*), dengan ukuran koloni kecil hingga sedang setelah masa inkubasi 24-48 jam (Stephen & Saleh, 2023; Mohammed *et al.*, 2024). Tekstur koloni umumnya halus dan kadang tampak sedikit *creamy*, namun tidak berlendir. Munculnya koloni dengan karakteristik tersebut menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan media yang relatif asam dan mampu memanfaatkan nutrisi spesifik yang tersedia di dalam MRS Agar, yang merupakan salah satu ciri fisiologis penting dari bakteri asam laktat (Stephen & Saleh, 2023).

2. Uji katalase

Uji katalase merupakan uji biokimia sederhana yang digunakan dalam identifikasi bakteri untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme menghasilkan enzim katalase, yaitu enzim yang berperan dalam melindungi sel bakteri dari efek toksik hidrogen peroksida yang terbentuk selama proses metabolisme. Uji ini dilakukan dengan meneteskan larutan hidrogen peroksida pada koloni bakteri, kemudian diamati terbentuknya gelembung gas sebagai hasil penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Munculnya gelembung dalam waktu singkat menunjukkan reaksi katalase positif, sedangkan tidak adanya gelembung menandakan reaksi negatif.

Pelaksanaan uji katalase perlu memperhatikan teknik yang tepat, termasuk penggunaan larutan hidrogen peroksida dengan konsentrasi sesuai serta alat yang tidak menimbulkan reaksi palsu, agar hasil yang diperoleh dapat diinterpretasikan dengan benar. Uji katalase banyak digunakan sebagai uji awal karena bersifat cepat, mudah, dan membantu membedakan kelompok bakteri tertentu dalam proses identifikasi laboratorium (Hafezi & Khamar, 2024). Uji katalase pada bakteri asam laktat harus menunjukkan hasil negatif karena bakteri asam laktat pada umumnya tidak memiliki enzim katalase.

Menurut Bintsis (2018), bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram positif, *non-sporing*, dan *non-respiring* yang berperan penting dalam fermentasi makanan. Sifat *non-respiring* ini mencerminkan metabolisme fermentatif BAL yang umumnya tidak memiliki enzim katalase, sehingga uji katalase pada BAL biasanya menunjukkan hasil negatif.

3. Uji pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram merupakan teknik pewarnaan dasar yang sangat penting dalam mikrobiologi karena digunakan sebagai langkah awal untuk membedakan bakteri berdasarkan struktur dinding selnya. Metode ini didasarkan pada perbedaan ketebalan lapisan peptidoglikan. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dan mampu mempertahankan warna ungu dari zat warna utama kristal violet, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis serta kandungan lipid yang lebih tinggi sehingga warna utama terlepas saat proses dekolorisasi dan selanjutnya menyerap pewarna safranin sehingga tampak berwarna merah muda. Prosedur pewarnaan Gram terdiri dari kristal violet, lugol, alkohol 95%, dan safranin.

Pada uji pewarnaan Gram, bakteri asam laktat menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan warna ungu, karena memiliki dinding sel tebal yang mampu mempertahankan zat warna kristal violet. Selain membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif, pewarnaan Gram juga memberikan informasi awal mengenai bentuk serta susunan sel bakteri, sehingga sangat membantu dalam proses identifikasi awal di laboratorium mikrobiologi (Paray *et al.*, 2023).

4. Uji pewarnaan endospora

Uji pewarnaan endospora merupakan metode pewarnaan diferensial untuk memastikan bahwa isolat yang diperoleh tidak termasuk dalam kelompok bakteri pembentuk spora. Uji ini dilakukan karena isolasi dari bahan pangan atau lingkungan fermentasi berpotensi mengandung bakteri kontaminan, khususnya dari kelompok *Bacillus* yang memiliki kemampuan membentuk endospora (A'yun dkk., 2023; Hidriya dkk., 2025).

Metode yang umum digunakan dalam uji endospora adalah metode pewarnaan Schaeffer-Fulton. Prinsip dari metode ini yakni menggunakan pewarna utama berupa *malachite green* yang dipanaskan agar dapat menembus lapisan pelindung endospora. Setelah proses pemanasan, preparat dicuci dengan air untuk menghilangkan kelebihan pewarna, kemudian diberi pewarna safranin untuk mewarnai sel vegetatif. Endospora akan tampak berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah di bawah mikroskop. Teknik ini efektif dalam membedakan bakteri pembentuk spora dan non-pembentuk spora secara visual (Yanti dkk., 2024).

Hasil uji endospora pada isolat bakteri asam laktat umumnya menunjukkan hasil negatif, yang ditandai dengan tidak ditemukannya struktur spora dan hanya

terlihat sel vegetatif. Hasil ini menjadi indikator penting dalam proses identifikasi, karena menguatkan bahwa isolat tersebut bukan termasuk bakteri pembentuk spora. Selain itu, hasil negatif juga menunjukkan bahwa isolat memiliki karakteristik yang sesuai dengan bakteri non-sporulatif, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk analisis lanjutan, seperti pengujian aktivitas antimikroba, ketahanan terhadap kondisi asam, maupun potensi sebagai probiotik (A'yun dkk., 2023; Hidriya dkk., 2025).

5. Uji Tipe Fermentasi

Uji tipe fermentasi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri asam laktat (BAL) dalam memfermentasi karbohidrat. Setiap isolat BAL memiliki kemampuan fermentasi yang berbeda, sehingga parameter ini dapat dimanfaatkan sebagai dasar dalam proses identifikasi dan karakterisasi. Selain itu, pola fermentasi yang dihasilkan juga berkaitan dengan jenis metabolit yang terbentuk serta potensi pemanfaatannya (Rawoof *et al.*, 2020; Abedi & Hashemi, 2020).

Secara umum, uji tipe fermentasi dilakukan dengan mengamati pembentukan gas menggunakan tabung Durham pada media cair yang mengandung sumber karbohidrat. Prinsip dari metode ini adalah mendeteksi adanya gas karbon dioksida (CO₂) sebagai hasil fermentasi. Jika terbentuk gelembung gas di dalam tabung Durham, maka isolat tersebut tergolong bakteri heterofermentatif. Sebaliknya, jika tidak terbentuk gas, maka isolat termasuk bakteri homofermentatif (Mora *et al.*, 2020).

Hasil uji tipe fermentasi pada BAL umumnya terbagi menjadi dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif menghasilkan

asam laktat sebagai produk utama tanpa pembentukan gas, sedangkan BAL heterofermentatif menghasilkan produk tambahan seperti etanol atau asam asetat serta gas CO₂. Perbedaan ini menjadi indikator penting dalam proses identifikasi karena mencerminkan jalur metabolisme yang digunakan oleh bakteri. Selain itu, hasil uji ini juga memberikan gambaran mengenai potensi pemanfaatan isolat BAL dengan kemampuan fermentasi yang beragam memiliki peluang lebih besar untuk diaplikasikan dalam bidang pangan dan kesehatan (Ayivi *et al.*, 2020).

E. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat

Identifikasi molekuler bakteri asam laktat dilakukan sebagai tahap lanjutan untuk mengonfirmasi hasil identifikasi awal secara lebih spesifik. Pada penelitian ini, identifikasi molekuler dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer universal 16S rRNA dan primer spesifik *Lactobacillus*. Pendekatan ini digunakan untuk memastikan bahwa isolat yang diperoleh termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat, khususnya genus *Lactobacillus*, sehingga dapat memperkuat hasil identifikasi fenotipik yang telah dilakukan.

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA bertujuan untuk memperoleh DNA yang murni dan berkualitas baik dari sel atau jaringan. Proses ini dilakukan dengan cara melisis sel untuk melepaskan DNA, kemudian memisahkannya dari komponen lain seperti protein, lipid, dan RNA. Keberhasilan ekstraksi DNA ditentukan oleh kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan, karena DNA yang terkontaminasi dapat mengganggu tahapan analisis selanjutnya. Berbagai metode ekstraksi DNA dapat digunakan, baik metode konvensional maupun berbasis kit komersial, dengan prinsip dasar

meliputi *lysis*, *binding*, *washing*, dan *elute*. DNA hasil ekstraksi selanjutnya dapat dievaluasi kualitas dan konsentrasinya menggunakan elektroforesis gel agarosa untuk memastikan DNA layak digunakan dalam analisis molekuler lanjutan (Gupta, 2019).

Kualitas DNA yang baik umumnya ditunjukkan oleh pita DNA yang terlihat jelas, tidak terdegradasi, dan bebas dari kontaminan, sehingga dapat menghasilkan amplifikasi yang optimal pada tahap PCR. Keberhasilan proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis sampel, kondisi sel, metode yang digunakan, serta ketelitian selama proses berlangsung. Pada bakteri Gram positif, termasuk bakteri asam laktat, proses lisis sel cenderung lebih sulit karena dinding selnya lebih tebal, sehingga sering diperlukan perlakuan tambahan, misalnya dengan enzim atau bahan kimia tertentu untuk membantu memecah dinding sel (Dash, Das & Thatoi, 2021). Oleh karena itu, tahap ekstraksi DNA menjadi bagian penting dalam analisis molekuler, karena kualitas DNA yang diperoleh akan sangat menentukan keberhasilan tahap berikutnya, seperti amplifikasi menggunakan PCR (Green & Sambrook, 2021).

2. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi DNA yang digunakan untuk menggandakan fragmen DNA target secara spesifik dalam kondisi *in vitro*. Teknik ini banyak dimanfaatkan dalam identifikasi mikroorganisme karena mampu mendeteksi materi genetik secara cepat dan akurat. Proses PCR berlangsung dalam tiga tahapan utama, yaitu *denaturasi*, *annealing*, dan *extension*. Ketiga tahapan ini dilakukan secara berulang selama beberapa siklus menggunakan alat *Thermal Cycler*. Keberhasilan PCR dipengaruhi oleh beberapa komponen

penting seperti DNA cetakan, primer spesifik, enzim DNA polimerase, dNTP, serta ion magnesium (Putra *et al.*, 2024). PCR memiliki berbagai variasi, termasuk PCR konvensional, PCR *multiplex*, dan PCR *real-time*, yang penggunaannya disesuaikan dengan tujuan analisis.

Dalam identifikasi bakteri, PCR digunakan untuk mendeteksi target DNA tertentu menggunakan primer spesifik sehingga memungkinkan identifikasi kelompok bakteri secara lebih tepat. Pada penelitian ini, digunakan primer 16S rRNA dan primer spesifik *Lactobacillus* untuk mengonfirmasi isolat hingga tingkat genus (Putri & Achyar, 2023).

a. PCR dengan primer gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA merupakan salah satu penanda molekuler yang paling banyak digunakan dalam identifikasi bakteri di bidang mikrobiologi, termasuk pada laboratorium klinik dan penelitian laboratorium medis. Gen 16S rRNA digunakan sebagai penanda molekuler dalam identifikasi bakteri karena memiliki keunggulan yang tidak dimiliki oleh gen lain. Gen ini terdapat pada hampir seluruh bakteri dan memiliki daerah yang bersifat konservatif, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan bakteri secara umum. Selain itu, gen 16S rRNA juga memiliki bagian variabel yang memungkinkan pembedaan antar kelompok bakteri. Panjang gen ini sekitar ± 1.500 bp, sehingga cukup representatif dalam memberikan informasi genetik tanpa menyulitkan proses analisis (Church *et al.*, 2020).

Identifikasi molekuler dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer universal 16S rRNA untuk mendeteksi DNA bakteri dari isolat yang diperoleh. Primer universal tersebut bekerja dengan menempel pada daerah konservatif gen 16S rRNA, sehingga memungkinkan amplifikasi gen target

secara luas. Hasil amplifikasi kemudian diamati melalui elektroforesis gel agarosa berdasarkan munculnya pita DNA pada ukuran tertentu, yang menunjukkan bahwa proses amplifikasi berjalan dengan baik (Dash, Das & Thatoi, 2021).

Penggunaan gen 16S rRNA berfungsi sebagai tahap awal untuk memastikan keberadaan bakteri sebelum dilakukan identifikasi lebih spesifik menggunakan primer lain. Pendekatan ini dinilai cukup efektif karena mampu memberikan hasil yang cepat dan sensitif, meskipun masih memiliki keterbatasan dalam membedakan bakteri yang berkerabat dekat (Kim *et al.*, 2020).

b. PCR dengan primer *Lactobacillus*

Selain menggunakan primer universal 16S rRNA, identifikasi bakteri juga dapat dilakukan dengan menggunakan primer spesifik yang menargetkan kelompok bakteri tertentu, seperti *Lactobacillus*. Primer jenis ini dirancang untuk mengenali urutan DNA yang khas pada genus tertentu, sehingga dapat meningkatkan ketepatan identifikasi dibandingkan primer universal yang bersifat lebih umum. Penggunaan primer spesifik *Lactobacillus* dalam teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memungkinkan deteksi yang lebih selektif terhadap bakteri dalam genus tersebut. Primer akan berikatan dengan bagian DNA yang spesifik, sehingga proses amplifikasi hanya terjadi apabila DNA target sesuai. Hasil amplifikasi kemudian diamati melalui elektroforesis gel agarosa berdasarkan munculnya pita DNA dengan ukuran tertentu, yang menunjukkan bahwa isolat yang diuji mengarah pada genus *Lactobacillus* (You & Kim, 2020).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa primer spesifik *Lactobacillus* menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran sekitar 341 bp, tergantung pada gen target yang digunakan. Ukuran fragmen ini cukup khas untuk membedakan

Lactobacillus dari kelompok bakteri lain, sehingga sering dimanfaatkan sebagai penanda dalam identifikasi berbasis PCR (Walter *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2004; Tenea & Suárez, 2020). Selain itu, penggunaan primer spesifik juga memiliki keunggulan dalam meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi, terutama pada sampel yang mengandung berbagai jenis bakteri. Hal ini membantu meminimalkan amplifikasi DNA non-target, sehingga hasil yang diperoleh menjadi lebih akurat dan mudah diinterpretasikan. Namun, keberhasilan amplifikasi tetap dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti kualitas DNA hasil ekstraksi, kondisi reaksi PCR, serta kesesuaian primer dengan target DNA (Dash, Das & Thatoi, 2021). Penggunaan primer spesifik ini melengkapi identifikasi menggunakan primer 16S rRNA, sehingga hasil yang diperoleh menjadi lebih terarah. Meskipun demikian, identifikasi yang dihasilkan umumnya masih terbatas pada tingkat genus dan belum dapat memastikan spesies secara pasti.

F. Aktivitas Antibakteri Bakteri Asam Laktat

1. Mekanisme antibakteri bakteri asam laktat

Bakteri asam laktat (BAL) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen melalui berbagai mekanisme antibakteri. Aktivitas antibakteri BAL berkaitan dengan produksi senyawa metabolit selama proses pertumbuhan dan fermentasi. Senyawa-senyawa tersebut, seperti asam organik, bakteriosin, dan hidrogen peroksida bekerja secara sinergis dengan menurunkan pH lingkungan, merusak integritas membran sel, serta mengganggu sistem metabolisme bakteri patogen (Ibrahim *et al.*, 2021).

a. Produksi asam organik

BAL menghasilkan berbagai asam organik sebagai produk utama metabolisme selama proses pertumbuhan dan fermentasi, dengan asam laktat sebagai komponen dominan. Selain asam laktat, BAL juga dapat menghasilkan asam organik lain seperti asam asetat dan asam format dalam jumlah tertentu. Akumulasi asam-asam organik tersebut menyebabkan penurunan pH lingkungan secara signifikan, sehingga menciptakan kondisi yang tidak mendukung bagi pertumbuhan bakteri patogen yang umumnya bersifat sensitif terhadap lingkungan asam. Penurunan pH ini berperan penting dalam menghambat aktivitas enzim dan proses fisiologis sel patogen (Ibrahim *et al.*, 2021).

Selain menurunkan pH lingkungan, aktivitas antibakteri asam organik juga dipengaruhi oleh kemampuannya dalam bentuk tidak terdisosiasi untuk menembus membran sel bakteri patogen. Setelah berada di dalam sel, asam tersebut akan terurai dan melepaskan ion hidrogen sehingga menyebabkan kondisi sitoplasma menjadi lebih asam. Perubahan ini mengganggu keseimbangan ion dan kerja enzim penting dalam sel, serta memaksa bakteri menggunakan energi lebih besar untuk mempertahankan kestabilan internalnya. Akibatnya, pertumbuhan bakteri patogen terhambat dan pada kondisi tertentu dapat berujung pada kematian sel (Ibrahim *et al.*, 2021).

b. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan senyawa antimikroba berupa peptida atau protein yang diproduksi oleh BAL dan memiliki aktivitas penghambatan yang relatif spesifik terhadap bakteri lain, terutama bakteri Gram positif. Senyawa ini disintesis secara ribosomal dan dilepaskan ke lingkungan sebagai bagian dari mekanisme kompetisi

mikroba. Keberadaan bakteriosin memberikan keuntungan ekologis bagi BAL dalam mendominasi lingkungan fermentasi atau ekosistem mikroba tertentu (Ibrahim *et al.*, 2021).

Mekanisme kerja bakteriosin umumnya melibatkan interaksi langsung dengan membran sel bakteri target. Bakteriosin dapat membentuk pori pada membran sel atau meningkatkan permeabilitas membran, sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler penting seperti ion, asam amino, dan nukleotida. Selain itu, beberapa jenis bakteriosin juga diketahui mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri target. Kerusakan struktur dan fungsi membran ini menyebabkan terganggunya proses metabolisme esensial dan berujung pada kematian sel patogen, sehingga mendukung potensi BAL sebagai agen antibakteri alami (Ibrahim *et al.*, 2021).

c. Hidrogen peroksida

Selain menghasilkan asam organik dan bakteriosin, beberapa strain BAL juga mampu memproduksi hidrogen peroksida (H_2O_2) sebagai hasil metabolisme, khususnya pada kondisi lingkungan dengan ketersediaan oksigen. Hidrogen peroksida merupakan senyawa oksidatif yang memiliki aktivitas antimikroba melalui pembentukan spesies oksigen reaktif, sehingga berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang memiliki sistem pertahanan antioksidan yang lemah (Ibrahim *et al.*, 2021).

Hidrogen peroksida dapat merusak berbagai komponen penting sel bakteri patogen, termasuk membran sel, protein struktural, enzim, dan asam nukleat. Kerusakan oksidatif ini mengganggu stabilitas struktur sel dan fungsi metabolisme, yang selanjutnya menurunkan viabilitas bakteri patogen. Produksi hidrogen

peroksida oleh BAL juga berkontribusi dalam menciptakan lingkungan yang tidak kondusif bagi pertumbuhan mikroorganisme kompetitor, sehingga memperkuat efek antibakteri BAL secara keseluruhan (Ibrahim *et al.*, 2021).

2. Target bakteri patogen

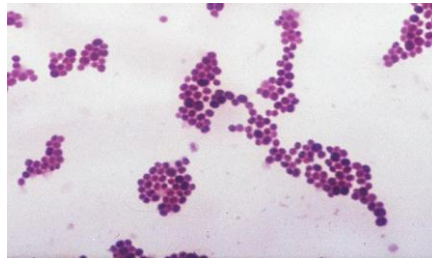
Christensen *et al.* (2021) melaporkan aktivitas antibakteri BAL efektif terhadap berbagai bakteri patogen, salah satunya *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini dikenal sebagai patogen oportunistik yang dapat menyebabkan berbagai infeksi pada manusia. Kemampuan BAL dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* menunjukkan potensi pemanfaatan BAL sebagai agen antibakteri alternatif, terutama dalam menghadapi meningkatnya resistensi antibiotik.

a. Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* yang diakui secara ilmiah (NCBI) sebagai berikut:

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kingdom	: <i>Bacillati</i>
Filum	: <i>Bacillota</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Staphylococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

b. Morfologi bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 2 Morfologi Bakteri *Staphylococcus aureus*
(Sumber Kamel & Jarjes, 2015)

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus dengan diameter sekitar 0,5-1,5 μm yang tersusun berkelompok tidak teratur menyerupai buah anggur. Susunan khas ini terjadi akibat pembelahan sel yang berlangsung pada beberapa bidang yang berbeda. Bakteri ini bersifat non-motil, tidak membentuk spora, dan tergolong anaerob fakultatif sehingga mampu tumbuh pada kondisi aerob maupun anaerob, meskipun pertumbuhannya lebih optimal pada kondisi aerob (Fayisa & Tuli, 2023).

Koloni *Staphylococcus aureus* pada media padat umumnya berbentuk bulat, halus, cembung, dan berwarna kuning keemasan hingga abu-abu, warna tersebut berasal dari pigmen karotenoid yang berperan dalam melindungi sel bakteri dari stres oksidatif. Bakteri ini bersifat katalase positif dan koagulase positif, yang menjadi ciri pembeda utama dengan spesies *Staphylococcus* lainnya. Selain itu, *Staphylococcus aureus* memiliki dinding sel peptidoglikan yang tebal serta mengandung asam teikoat yang berperan dalam stabilitas struktur dinding sel dan sifat antigenik bakteri (Mantiri, 2022).

Staphylococcus aureus mampu tumbuh pada rentang suhu yang luas (sekitar 7-48°C) dengan suhu optimum $\pm 37^\circ\text{C}$, serta toleran terhadap kadar garam tinggi hingga 10% NaCl. Bakteri ini juga dapat bertahan pada rentang pH yang cukup

lebar, yaitu pH 4,0-10,0, dengan pH optimum sekitar 6-7, yang mendukung kelangsungan hidupnya pada berbagai lingkungan, termasuk bahan pangan (Fayisa & Tuli, 2023).

c. Patogenitas bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan patogen oportunistik yang memiliki kemampuan menyebabkan berbagai jenis infeksi, mulai dari infeksi lokal ringan hingga infeksi sistemik yang berat. Proses patogenesis bakteri ini melibatkan tahap kolonisasi, invasi jaringan, penyebaran sistemik, serta produksi toksin. Meskipun dapat menjadi flora normal pada kulit dan mukosa, *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit ketika berhasil menembus pertahanan tubuh atau masuk ke jaringan internal (Fayisa & Tuli, 2023).

Virulensi *Staphylococcus aureus* sangat dipengaruhi oleh kemampuannya menghasilkan berbagai faktor virulensi, termasuk toksin dan enzim ekstraseluler. Toksin yang dihasilkan antara lain enterotoksin, toksin sindrom syok toksik (TSST-1), eksfoliatif toksin, serta hemolisin. Enterotoksin berperan penting dalam kejadian keracunan makanan, dengan gejala seperti mual, muntah, kram perut, dan diare yang muncul dalam waktu singkat setelah konsumsi pangan terkontaminasi. Sementara itu, eksfoliatif toksin dapat menyebabkan sindrom kulit melepuh, terutama pada bayi dan anak-anak (Mantiri, 2022).

Selain toksin, *Staphylococcus aureus* juga memproduksi berbagai enzim seperti koagulase, hialuronidase, lipase, protease, dan nuklease yang membantu bakteri menyebar dalam jaringan inang serta menghindari respon imun. Kemampuan membentuk kapsul dan biofilm turut meningkatkan daya tahan bakteri terhadap fagositosis dan antibiotik. Kombinasi faktor-faktor tersebut menjadikan *S. aureus*

sebagai salah satu bakteri patogen penting yang berperan dalam infeksi kulit, abses, pneumonia, bakteremia, endokarditis, hingga infeksi nosokomial, termasuk strain resisten seperti MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) (Fayisa & Tuli, 2023).

d. Resistensi antibiotik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus dikenal sebagai salah satu bakteri patogen dengan kemampuan tinggi dalam mengembangkan resistensi terhadap berbagai antibiotik. Resistensi ini muncul akibat tekanan selektif penggunaan antibiotik yang luas dan tidak rasional, baik di bidang klinis maupun non-klinis. Salah satu bentuk resistensi yang paling dikenal adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), yaitu strain *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik β -laktam, termasuk penisilin, metisilin, dan sefalosporin (Fayisa & Tuli, 2023). Mekanisme utama resistensi β -laktam pada *S. aureus* berkaitan dengan keberadaan gen *mecA*, yang mengkode protein pengikat penisilin alternatif, yaitu Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a). Protein ini memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik β -laktam, sehingga proses sintesis dinding sel tetap berlangsung meskipun bakteri terpapar antibiotik. Gen *mecA* terletak pada elemen genetik bergerak yang dikenal sebagai *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec), yang memudahkan penyebaran sifat resistensi antar strain *Staphylococcus aureus* (Mantiri, 2022).

Selain resistensi terhadap β -laktam, *Staphylococcus aureus* juga menunjukkan resistensi terhadap berbagai kelas antibiotik lain, seperti makrolida, aminoglikosida, tetrasiklin, dan fluorokuinolon. Mekanisme resistensi tersebut meliputi modifikasi target antibiotik, produksi enzim inaktivator, serta peningkatan aktivitas pompa efluks yang mengeluarkan antibiotik dari dalam sel. Kemampuan

Staphylococcus aureus membentuk biofilm turut memperparah masalah resistensi, karena struktur biofilm dapat menghambat penetrasi antibiotik dan melindungi sel bakteri dari respons imun inang (Fayisa & Tuli, 2023). Meningkatnya kasus *S. aureus* resisten antibiotik, terutama MRSA, menjadi tantangan serius dalam pengobatan infeksi karena pilihan terapi yang semakin terbatas. Kondisi ini mendorong pengembangan alternatif pengendalian bakteri, seperti penggunaan senyawa antibakteri alami, bakteriosin, dan agen biopreservatif berbasis mikroorganisme (Mantiri, 2022)

3. Metode pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri bakteri asam laktat (BAL) bertujuan menilai kemampuan BAL dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yakni *Staphylococcus aureus*. Dalam uji aktivitas antibakteri terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu metode dilusi dan metode difusi.

a. Metode dilusi

Metode dilusi merupakan salah satu teknik standar dalam uji aktivitas antimikroba yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi minimal suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme target. Metode ini dapat dilakukan dalam dua bentuk utama, yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*agar dilution*). Pada metode dilusi cair, zat antimikroba ditambahkan ke dalam media cair yang mengandung bakteri, dan hambatan pertumbuhan diamati berdasarkan ada tidaknya kekeruhan setelah inkubasi. Sementara itu, pada metode dilusi padat, senyawa antimikroba dicampur ke dalam media agar sebelum dituang, kemudian pertumbuhan mikroba diamati dengan melihat ada tidaknya koloni yang tumbuh setelah inkubasi (CLSI, 2018). Hasil pengujian metode dilusi dinyatakan

dalam Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), yaitu konsentrasi terendah dari senyawa antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba secara visual setelah periode inkubasi yang ditentukan (Kowalska-krochmal & Dudek-wicher, 2021). Metode ini umumnya digunakan untuk senyawa antimikroba yang larut dengan baik dalam media uji, agar distribusinya merata dan hasil yang diperoleh lebih akurat (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016).

Kelebihan metode dilusi antara lain bersifat kuantitatif, sehingga memungkinkan peneliti mengetahui secara tepat berapa banyak konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroba uji (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016). Selain itu, metode ini juga dapat digunakan untuk menguji beberapa isolat sekaligus dan memberikan informasi yang relevan untuk studi farmakokinetik dan farmakodinamik (CLSI, 2018). Namun, metode ini juga memiliki beberapa kelemahan, yaitu memerlukan waktu yang relatif lama dalam persiapan dan pengamatan, membutuhkan bahan dan alat yang cukup banyak, sehingga biaya operasionalnya tinggi, kurang praktis untuk uji skrining cepat karena melibatkan banyak langkah pengenceran secara manual, dan hanya dapat digunakan untuk senyawa yang larut sempurna dalam media uji, sehingga terbatas pada senyawa tertentu saja (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016).

b. Metode difusi

Metode difusi merupakan salah satu pendekatan yang sering digunakan dalam uji antibakteri secara *in vitro*. Prinsip dasar metode ini adalah difusi molekul senyawa antimikroba ke dalam media agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji, sehingga terbentuk zona bening sebagai indikator

penghambatan pertumbuhan bakteri (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016). Metode ini dapat diterapkan pada senyawa yang larut maupun yang memiliki kelarutan terbatas dalam media uji. Berdasarkan cara pemberian sampel, metode difusi dibagi menjadi tiga jenis utama, yaitu metode sumur agar (*agar well diffusion*), metode cakram (*disk diffusion*), dan metode parit (*ditch-plate method*) (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016).

Pada metode sumur agar, lubang dibuat pada media agar yang telah diinokulasi bakteri, kemudian diisi dengan larutan sampel antibakteri. Setelah inkubasi, terbentuk zona hambat berupa area bening di sekitar sumur yang diukur dengan jangka sorong atau penggaris presisi, dan dilaporkan dalam satuan milimeter (Jonasson *et al.*, 2020). Metode ini cenderung lebih sensitif dibandingkan cakram karena sampel langsung bersentuhan dengan media, sehingga difusi terjadi lebih efektif secara vertikal maupun horizontal (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016). Namun, metode sumur memiliki beberapa kelemahan, antara lain risiko kerusakan media sekitar sumur, variasi kedalaman sumur yang memengaruhi konsentrasi sampel, serta kemungkinan kebocoran jika sumur tidak rapat (Jonasson *et al.*, 2020).

Metode difusi cakram (*Kirby-Bauer disk diffusion*) merupakan teknik standar yang banyak dipakai untuk uji sensitivitas antibiotik. Kertas cakram yang mengandung senyawa antimikroba ditempatkan di permukaan agar yang telah diinokulasi bakteri. Senyawa tersebut berdifusi ke media membentuk gradien konsentrasi, dengan kadar tertinggi di dekat cakram dan menurun seiring jarak bertambah. Zona hambat diukur dan diinterpretasikan menurut standar klinis seperti CLSI atau EUCAST (Jonasson *et al.*, 2020). Kelebihan metode ini adalah praktis,

memungkinkan pengujian beberapa sampel sekaligus, dan hanya memerlukan sedikit volume sampel, tetapi kurang cocok untuk sampel bersifat kental atau sulit berdifusi dalam media padat (Balouiri, Sadiki & Ibsouda, 2016).

Metode difusi parit biasanya digunakan untuk sediaan semi-padat, seperti krim, salep, atau pasta. Parit dibuat sepanjang diameter cawan agar, sampel ditempatkan di dalam parit, dan bakteri uji diinokulasikan di kedua sisi. Setelah inkubasi, zona hambat diukur dari tepi parit ke arah pertumbuhan bakteri. Metode ini cocok untuk evaluasi formulasi topikal karena meniru kondisi aplikasi pada permukaan (Balouiri, Sadiki & Ibsouda, 2016).

Uji aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar agen antibakteri pada media uji yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Kategori diameter zona hambat dapat berbeda-beda tergantung pada referensi yang digunakan. Salah satu acuan yang sering digunakan adalah klasifikasi menurut Davis & Stout (1971), yang membagi daya hambat antibakteri berdasarkan diameter zona hambat menjadi lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat (Misriani, Manalu & Nasution, 2023).

Tabel 1
Kategori Diameter Zona Hambat

Kategori	Diameter zona hambat (mm)
Lemah	<5
Sedang	5-10
Kuat	10-20
Sangat Kuat	>20

(Sumber (Davis & Stout, 1971) dalam (Misriani, Manalu & Nasution, 2023))