

**IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
BAKTERIOSIN PADA DADIH DAN UJI AKTIVITAS
ANTIMIKROBANYA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains



Oleh:

ALFINA YULIANA

NIM. 17036041/2017

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2021**

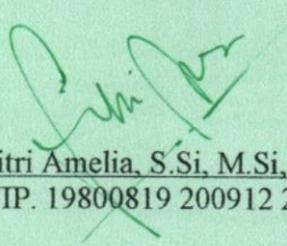
PERSETUJUAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL BAKTERIOSIN PADA DADIH DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBANYA

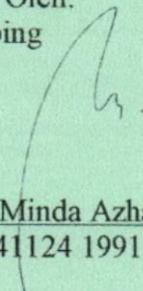
Nama : Alfina Yuliana
NIM : 17036041
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 04 November 2021

Mengetahui:
Ketua Jurusan Kimia


Fitri Amelia, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP. 19800819 200912 2 002

Disetujui Oleh:
Pembimbing


Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si
NIP. 19641124 199112 2 001

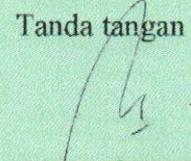
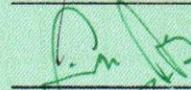
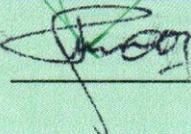
PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Alfina Yuliana
NIM : 17036041
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL BAKTERIOSIN PADA DADIH DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBANYA

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 04 November 2021

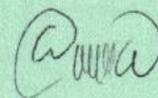
| | Tim Penguji | Tanda tangan |
|---------|----------------------------------|---|
| | Nama | |
| Ketua | : Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si |  |
| Anggota | : Fitri Amelia, S.Si, M.Si, Ph.D |  |
| Anggota | : Drs. Iswendi, M.Si |  |

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis saya, tugas akhir berupa skripsi dengan judul “Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin Pada Dadih Dan Uji Aktivitas Antimikrobanya”, adalah asli karya sendiri.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya, tanpa bantuan pihak lain, kecuali pembimbing.
3. Di dalam karya tulis ini, tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan di dalam naskah dengan menyebutkan pengarang dan dicantumkan pada kepustakaan.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila terdapat penyimpangan di dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini, serta sanksi lainnya sesuai norma dan ketentuan hukum yang berlaku.

Padang, 04 November 2021
Yang membuat pernyataan



Alfina Yuliana
17036041

Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin dan Uji Aktivitas Antimikrobanya

Alfina Yuliana

ABSTRAK

Bakteri dapat diidentifikasi secara fenotip dan genotip. Identifikasi secara fenotip membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan identifikasi secara genotip. Identifikasi secara genotip dilakukan dengan analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan genus atau spesies bakteri asam laktat penghasil bakteriosin pada dadih, melakukan uji aktivitas antimikrobanya dan memperkirakan ukuran protein bakteriosin. Massa molekul bakteriosin diperkirakan dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Identifikasi dilakukan dengan cara skrining dan isolasi bakteri asam laktat pada dadih, kemudian mengisolasi DNA kromosom isolat bakteri yang telah diperoleh (UBC-DTK-02). DNA kromosom bakteri digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR. Amplikon PCR dielektroforesis dengan gel agarose dan dimurnikan untuk dilakukan sekuensing dengan metode *Dideoxy-Sanger*. Hasil sekuensing dianalisa menggunakan *software* BioEdit. Selanjutnya, urutan basa nukleotida gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi spesies dengan menggunakan program BLASTn dan MEGA-X. Berdasarkan identifikasi diketahui isolat bakteri asam laktat penghasil bakteriosin UBC-DTK-02 termasuk spesies *Enterococcus faecalis*. Uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat penghasil bakteriosin UBC-DTK-02 dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram. Terbentuk zona hambat bening di sekitar kertas cakram pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteriosin UBC-DTK-02 yang diperoleh merupakan bakteriosin kelas III.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, bakteriosin, gen 16S rRNA, aktivitas antimikroba, SDS-PAGE

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang selalu memberi rahmat yang tidak terhingga kepada hamba-Nya, serta shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin pada Dadih dan Uji Aktivitas Antimikrobanya**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan mata kuliah Skripsi sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana sains pada program studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, arahan, dan saran yang berharga dari beberapa pihak. Berdasarkan hal ini, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku dosen Pembimbing.
2. Ibu Fitri Amelia, S. Si., M. Si., Ph. D dan Bapak Drs. Iswendi, M.S selaku dosen pembahas dan penguji.
3. Tim Riset Biokimia 2021 Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang.
4. Staf laboratorium jurusan Kimia Fmipa UNP

Penulisan skripsi ini telah dilakukan sebaik-baiknya, namun untuk kesempurnaan skripsi ini, diharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Atas kritik dan saran penulis mengucapkan terima kasih.

Padang, 17 Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| KATA PENGANTAR | ii |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR GAMBAR | v |
| DAFTAR TABEL | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | vii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Identifikasi Masalah | 3 |
| C. Batasan Masalah | 4 |
| D. Rumusan Masalah..... | 4 |
| E. Tujuan Penelitian | 4 |
| F. Manfaat Penelitian..... | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| A. Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Dadih | 6 |
| B. Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat | 13 |
| C. Uji Aktivitas Antimikroba | 15 |
| D. SDS – PAGE | 18 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 21 |
| A. Waktu dan Tempat Penelitian..... | 21 |
| B. Objek Penelitian | 21 |
| C. Alat dan Bahan Penelitian | 21 |
| 1. Alat | 21 |
| 2. Bahan..... | 22 |
| D. Prosedur Kerja | 22 |
| 1. Sterilisasi Alat Gelas | 22 |
| 2. Pembuatan Media Cair | 22 |
| 3. Pembuatan Media Padat | 23 |
| 4. Skrining dan Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Dadih..... | 23 |
| 5. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat..... | 25 |
| 6. Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin pada Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 7. Perkiraan Ukuran Massa Molekul Bakteriosin dengan Elektroforesis SDS-PAGE..... | 29 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 31 |
| A. Skrining dan Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Dadih..... | 31 |
| B. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat | 34 |
| 1. Isolasi dan Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri Asam Laktat | 34 |
| 2. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)..... | 37 |
| 3. Analisa Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA | 38 |
| 4. Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin pada Bakteri Patogen..... | 43 |
| 5. Perkiraan Ukuran Molekul Protein Bakteriosin dengan SDS-PAGE | 46 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 49 |
| A. Kesimpulan..... | 49 |
| B. Saran | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| LAMPIRAN..... | 56 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Reaksi Fermentasi Laktosa menjadi Asam Laktat | 8 |
| Gambar 2. Polimerisasi dan <i>Crosslinking</i> dari <i>Acrylamide</i> | 19 |
| Gambar 3. Dadih | 31 |
| Gambar 4. Isolat murni koloni bakteri asam laktat pada media MRS agar | 34 |
| Gambar 5. Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri | 36 |
| Gambar 6. Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16S rRNA metode PCR..... | 38 |
| Gambar 7. Potongan <i>electroporegram</i> Urutan Basa Nukleotida Gen 16S | 39 |
| Gambar 8. Urutan Basa Nukleotida Fragmen Gen 16S rRNA Menggunakan | 40 |
| Gambar 9. Urutan Basa Nukleotida Fragmen Gen 16S rRNA Menggunakan | 40 |
| Gambar 10. Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Isolat Bakteri UBC-DTK -02 | 41 |
| Gambar 11. Hasil Identifikasi Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA bakteri..... | 42 |
| Gambar 12. Pohon Filogenetika Isolat Bakteri UBC-DTK-02..... | 43 |
| Gambar 13. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba Isolat Bakteri Asam Laktat | 45 |
| Gambar 14. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba Isolat Bakteri Asam Laktat | 46 |
| Gambar 15. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE..... | 48 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih | 9 |
| Tabel 2. Pertumbuhan Koloni Bakteri Asam Laktat..... | 32 |
| Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Bakteriosin | 46 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Pembuatan media cair..... | 56 |
| Lampiran 2. Pembuatan media padat | 56 |
| Lampiran 3. Skrining dan isolasi bakteri asam laktat dari dadih..... | 57 |
| Lampiran 4. Isolasi DNA kromosom bakteri..... | 59 |
| Lampiran 5. Elektroforesis DNA kromosom bakteri..... | 61 |
| Lampiran 6. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode Polimerisasi Chain Reaction (PCR)..... | 62 |
| Lampiran 7. Uji Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat penghasil bakteriosin | 63 |
| Lampiran 8. Perkiraan ukuran bakteriosin menggunakan SDS-PAGE | 64 |
| Lampiran 9. Perkiraan massa molekul bakteriosin | 66 |
| Lampiran 10. Tabel penambahan ammonium sulfat..... | 67 |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebanyakan orang hanya mengenal produk olahan susu fermentasi dengan bahan dasar susu sapi, seperti yoghurt dan yakult. Padahal, sebenarnya ada produk olahan susu fermentasi lain menggunakan susu kerbau yang tidak kalah bermanfaat untuk kesehatan, yaitu dadih. Dadih merupakan produk susu fermentasi alami yang berasal dari Sumatera Barat, diolah secara tradisional dengan menuangkan susu kerbau ke dalam tabung bambu yang ditutup dengan daun pisang selama 48 jam (Yurliasni, 2010).

Proses fermentasi dapat terjadi secara alami karena mengandung bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan bakteri yang menguntungkan, aman dan tidak bersifat patogen, sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk pangan. Bakteri ini dapat menghambat bakteri pembusuk dan dapat menghambat bakteri patogen. Bakteri asam laktat yang terkandung pada dadih dipercaya mampu memberi manfaat yang sangat baik untuk kesehatan manusia, karena BAL dapat memproduksi berbagai komponen bioaktif yang memiliki efek fisiologis berbeda dan juga bersifat sebagai probiotik (Akuzawa & Surono 2002; Surono, 2003).

Bakteri asam laktat yang ada pada susu kerbau menyebabkan laktosa berubah menjadi asam laktat dengan bantuan enzim laktase. Asam laktat ini menyebabkan suasana asam, sehingga protein pada susu kerbau terdenaturasi dan susu akan mengental, karena protein terkoagulasi dan laktosa yang mengalami fermentasi (Prangdimurti, 2001). Selain menghasilkan asam laktat, bakteri asam laktat diketahui mampu menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin,

asam – asam organik dan hidrogen peroksida (Desniar et al., 2016). Bakteriosin adalah senyawa aktif turunan protein yang digunakan sebagai pengawet alami, sedangkan asam – asam organik adalah agen antimikroba yang banyak digunakan dalam industri pangan (Threon dan Lues, 2011).

Bakteriosin merupakan senyawa protein yang mempunyai efek bakterisidal terhadap mikroorganisme lain dan merupakan metabolit ekstraseluler berupa protein yang dihasilkan oleh BAL. Bakteriosin yang dihasilkan jenisnya berbeda dan memiliki aktivitas antimikroba yang bervariasi tergantung strain penghasilnya (Sunaryanto & Tarwadi, 2015). Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang mengkontaminasi makanan, sehingga sangat potensial digunakan sebagai pengawet makanan alami dan dianggap sebagai bahan biopreservatif karena adanya aktivitas antibakteri (Sambo *et al.*, 2013). Bakteriosin umumnya memiliki berat molekul yang kecil, untuk mengetahui perkiraan berat molekul protein bakteriosin dapat menggunakan SDS-PAGE.

Sumber bakteri pada dadih beragam, sehingga perlu diketahui dan diidentifikasi berapa macam bakteri asam laktat dan jenis bakteri lain yang terdapat di dalamnya (Rinanda, 2011). Isolat bakteri asam laktat dapat diidentifikasi secara fenotip dan genotip. Identifikasi secara genotip dilakukan dengan analisis secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA, untuk mengetahui jenis dan hubungan kekerabatannya dengan bakteri asam laktat lainnya (Kasi *et al.*, 2017). Gen 16S rRNA adalah yang paling umum digunakan sebagai penanda molekular dan digunakan kemiripan urutan basa nukleotidanya untuk mengidentifikasi kelompok bakteri hingga tingkat spesies. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1500 basa,

sehingga cukup memadai dan mempermudah dalam proses amplifikasi gen tersebut dengan metode PCR dan proses sekuensing (Syukur S & Purwati E, 2013). Dengan demikian bakteri asam laktat penghasil bakteriosin diidentifikasi dengan gen pengkode 16S rRNA menggunakan metode PCR dan sekuensing.

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang “Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin pada Dadih dan Uji Aktivitas Antimikrobanya”.

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang, dapat diidentifikasi beberapa masalah sebagai berikut :

1. Identifikasi isolat bakteri asam laktat dapat dilakukan secara fenotip, yaitu uji makroskopis (ukuran, bentuk dan warna koloni bakteri), uji mikroskopis (bentuk dan warna sel bakteri), motilitas (pergerakan bakteri) dan uji biokimia (fermentasi karbohidrat, maltosa, laktosa, monitol, sukrosa, uji katalase), tetapi pengerjaannya membutuhkan waktu yang lama.
2. Identifikasi isolat bakteri asam laktat dapat dilakukan secara genotip yaitu identifikasi molekuler melalui sekuen pengkode gen 16S rRNA, sekuensing dilakukan dengan metode *Dideoxy-Sanger* dan *Maxam Gilbert*, tetapi metode *Maxam Gilbert* jarang digunakan karena membutuhkan waktu yang lama.
3. Uji aktivitas antimikroba bakteriosin dapat dilakukan dengan metode dilusi dan difusi, tetapi metode dilusi lebih sulit pengerjaannya.
4. Ukuran massa molekul protein bakteriosin dapat diperkirakan dengan menggunakan SDS-PAGE.

C. Batasan Masalah

Agar penelitian yang akan dilakukan lebih terfokus, maka penulis membatasi masalah dari penelitian yaitu :

1. Identifikasi secara fenotip yang dilakukan yaitu hanya uji makroskopis saja
2. Identifikasi secara genotip dilakukan dengan cara molekuler menggunakan gen 16S rRNA dan proses sekuensing hanya dilakukan dengan metode *Dideoxy-Sanger*.
3. Uji aktivitas antimikroba hanya dilakukan dengan menggunakan uji difusi cakram.
4. Perkiraan ukuran massa molekul protein bakteriosin dengan menggunakan SDS-PAGE.

D. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana hasil bakteri asam laktat penghasil bakteriosin pada dadih yang diidentifikasi secara molekuler?
2. Bagaimana aktivitas antimikroba bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dari dadih pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*?
3. Bagaimana ukuran massa molekul protein bakteriosin yang diperkirakan dengan menggunakan SDS-PAGE?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut :

1. Menentukan kelompok genus atau spesies bakteri asam laktat penghasil bakteriosin pada dadih berdasarkan sekuen gen 16S rRNA

2. Menentukan aktivitas antimikroba bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dari dadih pada bakteri *Escherichia. coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Memperkirakan ukuran massa molekul bakteriosin menggunakan SDS-PAGE.

F. Manfaat Penelitian

Penelitian yang dilakukan diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Sebagai sumber informasi tentang gen 16S rRNA sebagai penentu spesies bakteri asam laktat penghasil bakteriosin.
2. Sebagai sumber informasi mengenai aktivitas antimikroba bakteriosin pada bakteri asam laktat.
3. Dapat dijadikan referensi untuk penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

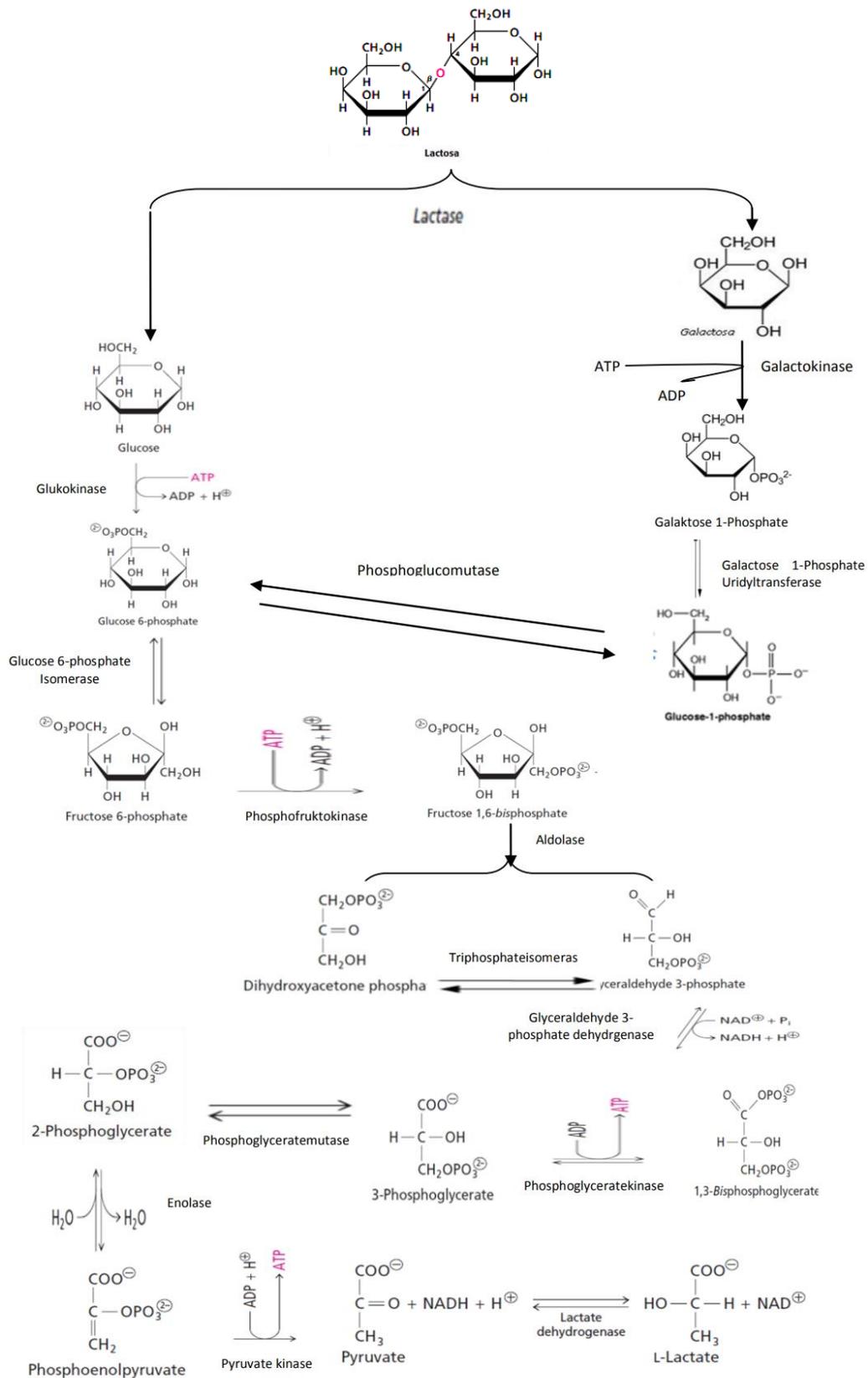
A. Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Dadih

Dadiah merupakan susu fermentasi tradisional alami susu kerbau yang berasal dari Sumatera Barat, Indonesia. Diolah dengan menuangkan susu kerbau ke dalam tabung bambu yang ditutup dengan daun pisang selama 48 jam pada suhu ruang, sehingga terjadi fermentasi secara alami oleh bakteri asam laktat. Adanya bakteri asam laktat yang terkandung pada dadiah terjadi secara spontan tanpa penambahan kultur *starter*, sehingga fermentasi juga terjadi secara spontan. Pertumbuhan bakteri asam laktat dalam fermentasi secara spontan tanpa penambahan kultur *starter* pada bahan baku ini tidak bisa dikontrol ataupun diprediksi secara tepat (Y. Widyastuti *et al.*, 2014). Bakteri asam laktat pada dadiah mampu memproduksi berbagai komponen bioaktif yang memiliki efek fisiologis berbeda dan bersifat sebagai probiotik, sehingga manfaatnya sangat baik bagi kesehatan manusia (Akuzawa dan Surono, 2002).

Dadiah merupakan produk susu fermentasi alami, berwarna putih, teksturnya seperti tahu, rasanya seperti yoghurt, dan umumnya disajikan sebagai makanan pelengkap yang lezat dalam beberapa acara adat di Padang, Sumatera Barat. Dadiah adalah produk bergizi tinggi, dimana kandungan protein dan lemaknya lebih tinggi dari pada yoghurt, kaya akan asam amino dan bakteri seperti *Lactobacillus sp.* serta rendah kolesterol (Surono, 2016). Dadiah memiliki kandungan gizi yang bervariasi, tergantung pada daerah produksinya. Menurut Sitrait dan Setiyanto (dalam Asli & Barat, 2013), kandungan dadiah adalah air 82,08%, lemak 8,08%, protein 6,99% dan memiliki pH 4,99 dengan keasaman 130,15°D. Dadiah memiliki daya cerna protein

yang cukup tinggi yaitu 86,4-97,7 % dan kandungan laktosa pada dadih yaitu 5,29 % dengan pH 3,4. Dadih juga mengandung vitamin A sebanyak 1,70 – 7,22 IU/gram, sehingga dadih menjadi makanan bergizi yang mudah diserap tubuh.

Bakteri asam laktat (BAL) dapat diisolasi dari produk pangan seperti : produk susu fermentasi (Agrawal N dan Prakash A. 2013, Mohammad SSD dan Ijjah UJJ. 2013, Taheri P *et al.*, 2011), produk fermentasi ikan, (Liasi SA Azmi *et al.*, 2009), susu kambing mentah (Rozila A *et al.*, 2011), ikan air tawar (Banerjee SP *et al.*, 2013), dan buah-buahan kering (Askari GA *et al.*, 2012). BAL termasuk kelompok bakteri gram positif yang berbentuk batang atau kokus dan bukan pembentuk spora. Dalam fermentasi karbohidrat, asam laktat dihasilkan sebagai produk akhir utama (Rattanachaikunsopon P dan Phumkachorn P, 2010). BAL merupakan kelompok bakteri yang dapat mengkonversi laktosa menjadi asam laktat (Harun *et al.*, 2020). Reaksi fermentasi laktosa menjadi asam laktat dapat dilihat pada Gambar 1. Selain menghasilkan asam laktat, bakteri asam laktat mempengaruhi rasa, tekstur dan nilai gizi makanan yang difermentasi olehnya, produksi atau modifikasi eksopolisakarida dan protein, dan produksi komponen nutrisi seperti vitamin (Wood dan Holzappel, 1995; Hugenholtz, 2008). Beberapa BAL, seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus* strain banyak digunakan dalam industri makanan dan farmasi karena memiliki sifat menyehatkan (Leroy & De Vuyst, 2004; van Hylckama Vlieg & Hugenholtz, 2007; Hugenholtz, 2008).



Gambar 1. Reaksi Fermentasi Laktosa menjadi Asam Laktat (Laurence, A. M *et al.*, 2012).

Ditemukan 36 strain *Streptococcus*, *Lactobacillus* dan *Lactococcus* dari hasil isolasi bakteri asam laktat yang terdapat pada dadih. Namun, bakteri non-BAL juga ditemukan, yaitu *Bacillus cereus*, *Micrococcus varian*, *Staphylococcus saprophyticus* dan khamir *Endomyces lactis*. Terdapat 26,26 % bakteri Gram-negatif dan 73,34 % bakteri Gram-positif pada dadih susu kerbau yang berasal dari Sumatera Barat. Beberapa spesies bakteri asam laktat yang ditemukan pada dadih dapat dilihat dalam Tabel 1 berikut (Asli & Barat, 2013).

Tabel 1. Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih

| Genus | Spesies | Referensi |
|----------------------|---|--|
| <i>Lactobacillus</i> | <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> <i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> | Ngatirah <i>et al.</i> , (2000); Pato (2003) |
| <i>Lactococcus</i> | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>Diacetylactis</i> | Hosono <i>et al.</i> , (1989); Surono dan Nurani (2001); Ngatirah <i>et al.</i> , (2000); Pato (2003) |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides</i> | Ngatirah <i>et al.</i> , (2000); Pato (2003) |
| <i>Streptococcus</i> | <i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> | Ngatirah <i>et al.</i> , (2000); Pato (2003) |
| <i>Enterococcus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> | Hosono <i>et al.</i> , (1989); Surono dan Nurani (2001); Ngatirah <i>et al.</i> , (2000); Pato (2003) |

(Asli & Barat, 2013).

Kelompok genus atau spesies bakteri asam laktat pada dadih dapat diidentifikasi secara fenotip dan genotip. Identifikasi fenotip dilakukan secara makroskopis (bentuk, warna dan ukuran koloni bakteri), mikroskopis (warna dan bentuk sel bakteri), motilitas dan uji biokimia dari bakteri. Identifikasi secara genotip membutuhkan waktu lebih singkat dan pengerjaannya cepat dan akurat

dibanding identifikasi secara fenotip, karena menggunakan gen 16S rRNA (Azhar, 2016).

Gen 16S rRNA tidak tergantung pada pertumbuhan dan media yang digunakan, sehingga gen 16S rRNA dimanfaatkan sebagai parameter sistematik molekular yang universal (Clarridge, 2004). RNA ribosomal (rRNA) paling banyak digunakan sebagai penanda molekular. Pada prokariot ada 3 jenis gen pengkode rRNA diantaranya 5S rRNA, 16S rRNA dan 23S rRNA. Ukuran basa yang dimiliki gen 16S rRNA cukup memadai, sehingga umum digunakan dalam proses amplifikasi gen ini dengan metode PCR dan proses sekuensing (Azhar, 2015).

Penggunaan teknik PCR dapat dengan mudah mengidentifikasi kelompok genus atau spesies pada bakteri asam laktat. Menurut Yi *et al* (dalam Macwana & Muriana, 2012) menggunakan variasi koloni PCR untuk memfasilitasi skrining koloni untuk bakteri asam laktat penghasil bakteriosin kelas II dengan pimer degenerasi berdasarkan pada daerah terminal-N yang banyak ditemukan pada bakteriosin kelas Iia dan primer spesifik untuk merancang reaksi PCR yang dihasilkan untuk pediosin, enterosin dan plantarisin.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode yang melibatkan tahap – tahap berulang (siklus), dimana setiap target DNA untai ganda akan mengalami duplikasi pada setiap siklus. Denaturasi termal memisahkan untai ganda DNA templat, kemudian didinginkan sampai waktu tertentu sehingga primer dapat menempel pada daerah target DNA tertentu (Handoyo & Rudiretna, 2001). Awalnya, metode PCR hanya digunakan untuk metode duplikasi DNA. Kemudian, metode PCR berkembang untuk duplikasi dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (Feranisa, 2016).

Proses PCR dapat terjadi dari 20 siklus sampai 30 siklus. Masing- masing siklus terdiri dari 3 langkah yaitu:

1. Denaturasi, dimana DNA untai ganda dipanaskan pada suhu 92 – 95°C pada tahap ini, untuk memisahkan untaian DNA dan memutuskan ikatan hidrogen yang menghubungkan kedua untaian DNA. Temperatur standardnya yaitu 94°C. Waktu yang dibutuhkan dalam proses denaturasi DNA menjadi untai tunggal biasanya 1-2 menit atau sampai 5 menit. Aktivitas enzim Taq-polymerase aktif pada tahap ini.
2. *Annealing*, pada tahap ini suhu diturunkan sampai primer dapat menempel pada untai DNA tunggal. Penempelan dilakukan pada suhu antara 36 – 72°C, suhu yang digunakan tergantung pada jenis primer, dimana semakin panjang ukuran primer semakin tinggi pula temperaturnya. Waktu yang diperlukan pada tahap annealing pada proses PCR antara 30-45 detik (Rahman *et al.*, 2013).
3. *Extention* primer, merupakan tahap perpanjangan primer. Perpanjangan primer pada setiap templat dimulai dari 5' menuju 3' dari untai DNA. Biasanya suhu pada tahap ini yaitu 72°C dengan waktu yang digunakan adalah 5 menit agar terbentuk DNA untai ganda pada produk PCR (Taški-Ajduković *et al.*, 2017).

Komponen-komponen dasar yang digunakan dalam proses PCR diantaranya *template* DNA, sepasang primer, enzim *taq polymerase*, nukleotida, dan buffer (Rahman *et al.*, 2013). Dalam menentukan tingkat keberhasilan proses amplifikasi DNA menggunakan PCR diketahui dari beberapa faktor, diantaranya : deoksiribonukleotida triphosphate (dNTP), cetakan DNA, oligonukleotida primer, jumlah siklus yang dilakukan, komposisi buffer dan faktor lainnya. Amplikon PCR

(hasil amplifikasi DNA dengan PCR) hasilnya dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel agarosa (Feranisa, 2016).

Hasil elektroforesis dapat dilihat dan dianalisis ketika DNA di dalam gel agarosa diwarnai menggunakan EtBr (*ethidium bromida*). EtBr adalah zat pewarna yang dapat mengalami fluoresensi dibawah sinar uv, dapat menyisip di antara basa DNA dan menyebabkan rantai DNA menjadi kaku. Bentuk hasil amplifikasi DNA terlihat sebagai pita terang dan jelas jika gel agarosa yang didalamnya membawa DNA diletakkan di atas sinar uv (Riuwpassa *et al.*, 2008).

Untuk mengetahui spesies bakteri dan menentukan urutan basa nukleotida pada DNA, dilakukan proses sekuensing pada produk PCR yang dihasilkan. Metode yang digunakan ada dua yaitu *Dideoxy-Sanger* dan *Maxam-Gilbert*. Metode *Dideoxy-Sanger* lebih sering digunakan karena lebih sederhana dan lebih cepat. Prinsip Sekuensing dengan metode *Dideoxy-Sanger* adalah perpanjangan primer yang menempel pada *template* yang akan disekuen sampai sebuah nukleotida pengakhir rantai berikatan (Resisten *et al.*, 2013)

Data hasil sekuensing dalam bentuk *electropherogram* dianalisis dengan program bioinformatika, diantaranya program BioEdit, program (BLAST) *Basic Local Alignment Search Tool*, dan software *Molecular Evolution Genetic Analysis* (MEGA). Program BioEdit yaitu sebuah software komputer yang digunakan untuk mendeteksi atau menganalisis data sekuen hasil sekuensing DNA. Prinsip kerjanya yaitu hasil data sekuensing berupa grafik atau kromatogram diterjemahkan menjadi urutan basa nukleotida. Program BLAST merupakan program yang digunakan untuk analisis penjajaran yang bertujuan untuk membandingkan data yang diperoleh dengan sekuen DNA yang ada di seluruh dunia yang tersedia pada

database GenBank sekuen publik. Program ini dapat diakses pada website *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Program bioinformatika selanjutnya yaitu software MEGA, digunakan untuk menganalisa sekuen dari DNA dan protein yang bertujuan menentukan kekerabatan, genom, pola molekuler dari gen dan spesies. Pada MEGA versi 6.0 menambahkan fasilitas untuk membentuk pohon evolusi molekuler yang disebut dengan *timetrees*, yang berguna bagi saintis sebagai sebuah kenaikan jumlah pengetahuan yang melaporkan perbedaan spesies, untai dan duplikasi gen (Widyadnyana *et al.*, 2015).

B. Bakteriosin dari Bakteri Asam Laktat

Bakteriosin adalah peptida antimikroba yang disekresikan ke lingkungan, disintesis oleh ribosom dan menghambat strain yang terikat erat (Delves-Broughton, dkk., 1996). Penelitian sebelumnya diketahui bahwa bakteriosin memiliki efek antimikroba yang tinggi terhadap banyak bakteri patogen dalam makanan. Ribosom dapat disintesis dan mudah terdegradasi oleh enzim pencernaan, sehingga bakteriosin berperan sebagai antimikroba alami yang berbeda dengan antibiotik (Cotter *et al.*, 2005). Bakteriosin merupakan zat antimikroba berupa peptida, protein, atau senyawa yang mirip protein. Bakteriosin dapat mencegah sintesis peptidoglikan yang utuh, sehingga dinding sel akan melemah dan akibatnya sel bakteri akan mengalami lisis. Oleh karena itu, dalam berbagai penelitian bakteriosin direkomendasikan sebagai alternatif yang digunakan untuk mengawetkan makanan, seperti: daging, produk susu, makanan kaleng, sup instan, dan juga aplikasi terapeutik di bidang medis (Delves-Broughton, 1996, Silva *et al.*, 2018).

Bakteriosin merupakan antimikroba yang diproduksi oleh bakteri untuk membunuh bakteri lain atau menghambat pertumbuhan bakteri yang melawan pertumbuhan bakteri gram positif. BAL banyak menghasilkan bakteriosin yang telah terbukti aman dan efektif sebagai pengawet makanan alami. Bakteriosin yang dihasilkan BAL dapat dibagi menjadi empat kelas. Bakteriosin kelas I, lantibiotik (mengandung lantionin) peptida kecil, berukuran <5 kDa dan stabil terhadap panas. Bakteriosin kelas II, kecil, mengandung non lantionin dan stabil terhadap panas (biasanya <10 kDa). Bakteriosin kelas III, bakteriosin yang sensitif terhadap panas dan mempunyai molekul yang besar (>10 kDa) dan bakteriosin kelas IV, yaitu bakteriosin dengan protein kompleks yang mengandung bagian karbohidrat (Cleveland, J *et al.*, 2001).

Penghasil bakteriosin selain bakteri asam laktat telah banyak diidentifikasi diantaranya nisin, disintesis oleh *Lactococcus lactis*, yang telah diakui dan disetujui aman digunakan untuk makanan atau disebut dengan (*Generally Recognized as Safe* (GRAS) oleh *Food and Drug Administration* (FDA) (Cotter *et al.*, 2005). Bakteriosin juga digunakan dalam fermentasi, diperoleh dari konsentrasi produk fermentasi yang mengandung bakteriosin, seperti produk fermentasi penghasil pediosin (O'Shea *et al.*, 2013). Berbagai penelitian telah menunjukkan efek sediaan bakteriosin dalam menghambat bakteri patogen dalam sistem pangan seperti, keju, sosis dan yogurt (Bierbaum dan Sahl, 2009).

Bakteriosin telah digunakan sebagai pengawet alami (biopreservatif) dan alternatif yang sangat baik digunakan untuk antibiotik dalam aktivitas antibakteri (Cotter *et al.*, 2013). Menariknya, beberapa bakteriosin kuat melawan patogen bawaan makanan yang tahan terhadap berbagai obat (Yi *et al.*, 2016). Oleh karena

itu, bakteriosin yang dihasilkan BAL adalah salah satu kandidat paling menjanjikan yang digunakan untuk mengendalikan patogen bawaan makanan (Yi *et al.*, 2020).

C. Uji Aktivitas Antimikroba

Bakteri patogen pada makanan dapat menyebabkan penyakit, komplikasi, dan bahkan kematian setelah dikonsumsi, karena terkontaminasi oleh mikroorganisme dan atau racun (Heredia & García 2018). Secara global, patogen menyebar luas melalui perjalanan ataupun perdagangan internasional. Akibatnya, patogen bawaan pada makanan menjadi ancaman besar bagi kesehatan masyarakat, terutama remaja, lansia, dan wanita hamil (Zhang *et al.*, 2017).

Metode biologi seperti antibiotik, terapi antimikroba menggunakan klorheksin, povidon iodine, fluorida, dan penisilin telah digunakan beberapa tahun terakhir. Penerapan aplikasi antibiotik spektrum luas dan terapi antimikroba dapat menekan infeksi yang dibawa mikroba, tetapi tidak hilang secara total. Tidak ada dari metode biologi tersebut yang berhasil mencegah pertumbuhan sisa bakteri patogen atau infeksi, sehingga terapi antibiotik dan antimikroba harus diberikan secara berkala untuk hasil yang efektif (Anderson MH dan Shi W., 2006).

Elie Metchnikoff berasal dari Rusia, memperoleh hadiah Nobel dalam penemuan probiotik yang revolusioner. Probiotik adalah organisme yang dapat meningkatkan keseimbangan mikroba di usus inangnya. Bakteri asam laktat dan bifidobakteri adalah jenis mikroba yang umum digunakan sebagai probiotik. Mereka memiliki daya rekat yang lebih besar ke jaringan daripada bakteri patogen sehingga dapat bertindak secara kompetitif untuk menghambat bakteri patogen, tetapi tidak menghambat pertumbuhan bakteri baik (Anderson MH dan Shi W., 2006).

Uji aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi. Petunjuk terjadinya penghambatan oleh suatu senyawa antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri dalam ekstrak diketahui dengan melakukan pengukuran diameter zona bening (*clear zone*) pada uji difusi (Hermawan, Eliyani, & Tyasningsih, 2007). Beberapa pengujian terhadap aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara :

1. Metode Difusi

Prinsip kerja dari penentuan aktivitas antimikroba dengan metode ini adalah berdasarkan pada kemampuan terdifusinya senyawa antimikroba pada media setelah diinokulasikan dengan mikroba uji. Pada metode ini diperoleh hasil berupa terbentuk atau tidaknya zona hambatan pada pertumbuhan bakteri, yaitu daerah bening di sekeliling zat antimikroba selama masa inkubasi (Brooks dkk, 2007). Metode ini terdiri dari tiga cara yaitu:

a. Cara Cakram (*Disk*)

Cara cakram ini, menggunakan suatu *paper disk* (cakram kertas saring) yang berfungsi untuk menampung zat antimikroba. Hasil dari cara ini ditandai dengan ada atau tidaknya zona hambat pertumbuhan bakteri berupa *clear zone* (daerah bening) di sekeliling kertas cakram. Kelebihan dari cara ini adalah tidak menggunakan peralatan yang khusus, relatif murah dan mudah dilakukan. Sedangkan kekurangannya yaitu ukuran *clear zone* yang terbentuk tergantung dengan kondisi inkubasi, preinkubasi, inokulum, dan predifusi serta ketebalan medium yang digunakan.

b. Cara Parit (*Ditch*)

Pada cara ini, dilakukan dengan membuat lempengan agar seperti sebidang parit yang sudah diinokulasikan dengan bakteri uji. Senyawa antimikroba yang diisi pada parit diinkubasi dengan waktu dan temperatur optimum sesuai dengan mikroba uji. Pengamatan yang dilakukan adalah memperhatikan terbentuk atau tidaknya zona hambatan pada pertumbuhan bakteri berupa daerah bening di sepanjang parit.

c. Cara Sumuran (*Hole/Cup*)

Pada cara ini, dilakukan dengan mengisi zat mikroba uji pada lubang yang dibuat pada lempengan agar setelah diinokulasikan bakteri uji, lalu diinkubasi dengan suhu yang telah disesuaikan. Hasil dari cara ini ditandai dengan terbentuk atau tidaknya zona hambatan berupa daerah bening yang terdapat disekeliling lubang.

2. Metode Dilusi

Dalam metode ini zat antimikroba dicampurkan dengan media agar yang diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil yang diperoleh yaitu tumbuh atau tidaknya mikroba pada media tersebut. Ada dua cara pada metode ini yaitu:

a. Pengenceran Serial dalam Tabung

Pada cara ini, inokulum larutan bakteri dengan berbagai konsentrasi diisikan pada sederetan tabung reaksi. Pengenceran dilakukan pada senyawa yang akan diuji aktivitas antimikrobanya di dalam media cair dan diinokulasikan bakteri patogen, lalu diinkubasi dengan temperatur dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji.

b. Penipisan Lempeng Agar

Pada cara ini, pengenceran dilakukan pada senyawa antimikroba dalam media agar. Bakteri patogen diinokulasikan pada media agar yang telah membeku, lalu diinkubasi pada waktu dan temperature yang telah disesuaikan. Larutan zat antimikroba dengan konsentrasi paling rendah yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dinyatakan sebagai KHM (Konsentrasi Hambat Minimal) (Burt sara, 2004).

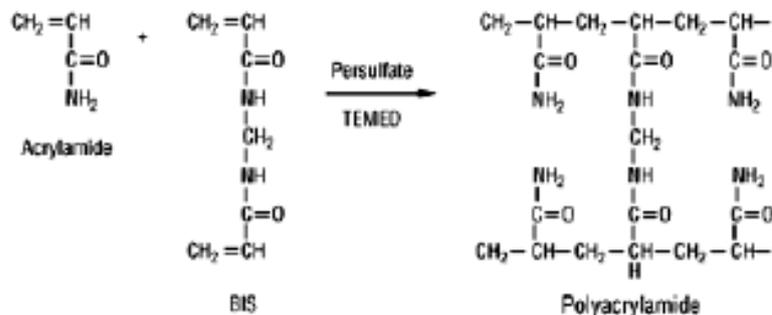
D. SDS – PAGE

Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS–PAGE) adalah suatu metode yang dilakukan untuk pemisahan rantai polipeptida pada protein. Hal tersebut tercapai dengan penambahan deterjen SDS dan pemanasan, dilakukan dengan tujuan agar ikatan disulfida terputus dengan merusak struktur protein, kemudian direduksi menjadi gugus sulfihidril. Gugus – gugus anionik dari SDS menyebabkan akan terbentuk kompleks antara SDS dengan protein, dimana kompleks tersebut bermuatan negatif (Hermes, 1998).

SDS merupakan suatu detergen yang dapat memberikan muatan listrik negative pada protein di dalam sampel dan melapisi sebagian besar protein yang sebanding dengan berat molekulnya. SDS memiliki fungsi untuk mendenaturasi protein dimana terputusnya ikatan yang ada didalam protein (Westermeier, 2004).

Gel poliakrilamid adalah suatu medium yang memisahkan protein berdasarkan ukurannya, dimana jika ukuran pori-porinya kecil akan terjadi perlambatan pada gerakan molekul. Gel ini terbentuk karena proses polimerisasi radikal bebas akrilamid (C_3H_5NO) dengan gen *cross linking* N,N' -*Metilenbisacrylamide* ($C_7H_{10}N_2O_2$) (Wilson dan Walker, 2000). Reaksi

Polimerisasi dan *Crosslinking* dari *Acrylamide* dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Polimerisasi dan *Crosslinking* dari *Acrylamide* (Azhar, 2016).

Perkiraan berat molekul protein sampel menggunakan SDS-PAGE dilakukan dengan pengukuran pada jarak migrasi protein standar dan migrasi protein sampel. Penyediaan protein sampel untuk analisis menggunakan SDS-PAGE adalah ditambahkan buffer sampel yang mengandung 1% SDS dengan atau tanpa penambahan zat pereduksi seperti 20 mM DTT, TCEP atau 2-mercaptoethanol (BME) ke dalam protein sampel, lalu dipanaskan dengan cara direbus dalam air mendidih selama 3-5 menit agar protein sampel terdenaturasi. Lalu sampel didinginkan hingga mencapai suhu ruang sebelum dipipet ke sumur sampel pada gel. Karena buffer mengandung gliserol dan protein lebih berat dari pada air, maka protein akan tenggelam ke bagian bawah sumur setelah sampel dimasukkan ke sumur gel SDS-PAGE. Pewarna biru bromophenol ditambahkan pada buffer sampel, sehingga dapat mempermudah pemantauan pada proses elektroforesis (Azhar, 2016).

Setelah dipisahkan pita protein dengan elektroforesis gel poliakrilamid, protein tersebut dapat ditransfer ke membran untuk divisualisasikan langsung dalam gel menggunakan metoda deteksi atau berbagai pewarnaan. Reagen yang

umum digunakan untuk menstaining pita protein gel elektroforesis adalah *Coomassie dye*. Residu hidrofobik dari protein berikatan dengan *Coomassie dye* pada kondisi asam, sehingga dapat merubah pita protein menjadi berwarna biru. Berdasarkan perbedaan komposisi protein dan aksi kimia protein, maka *coomassie dye* akan mendeteksi beberapa protein yang lebih baik dari protein lain. Pada kebanyakan protein, paling sedikit ada 10 ng per pita dalam sebuah gel mini yang dapat dideteksi oleh reagen *Coomassie dye* (Azhar, 2016).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Berdasarkan identifikasi genotip menggunakan gen 16S rRNA, isolat bakteri UBC-DTK-02 termasuk ke dalam kelompok genus *Enterococcus* dan spesies *Enterococcus faecalis*.
2. Bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*, ukuran zona hambat bening yang terbentuk akibat aktivitas antimikroba bakteriosin terhadap bakteri *Eschericia coli* adalah 10,04 – 12,00 mm dan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 12,00 – 13,76 mm.
3. Ukuran massa molekul bakteriosin isolat UBC-DTK-02 yang diperoleh sekitar ~11 kDa.

B. Saran

1. Peneliti selanjutnya disarankan mengisolasi bakteriosin dari bakteri asam laktat dan dimurnikan, kemudian dilakukan uji lebih lanjut sehingga dapat diaplikasikan dalam penggunaan sebagai bahan pengawet alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Akuzawa R, Suroño IS. (2002). Fermented milks of Asia. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF, editors. *Encyclopedia of dairy sciences*. London (UK): Academic Press Ltd.
- Alonso, A. (2013). DNA Extraction and Quantification. In *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition* (2nd ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00039-8>
- Anderson MH, Shi W. 2006. A Probiotic Approach to Caries Management. *Pediatr Dent*, 28 : 15.
- Askari GA, Kahouadji A, Khedid K, Charof R, Mennane Z. *J Sci Res* 2012; 11(2) :209-212.
- Asli, P., & Barat, S. (2013). Pengembangan Dadih Sebagai Pangan Fungsional Probiotik Asli Sumatera Barat. *Pengembangan Dadih Sebagai Pangan Fungsional Probiotik Asli Sumatera Barat*, 32(1), 20–29. <https://doi.org/10.21082/jp3.v32n1.2013.p20-29>
- Azhar, M. 2015. "Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi Tanamaban Dahlia". FMIPA UNP.
- Azhar, M. (2016). *Biomolekul sel*. [http://repository.unp.ac.id/454/1/Minda Azhar-eBuku Biomolekul sel-2016.pdf](http://repository.unp.ac.id/454/1/Minda%20Azhar-eBuku%20Biomolekul%20sel-2016.pdf)
- Banerjee SP, Dora KC, Chowdury S. *J Food Sci Technol* 2013; 50(1) :17-25
- Bierbaum, G., & Sahl, H. G. 2009. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18
- Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA, Jawetz, Melnick & Adelberg. 2007. *Medical Microbiology*. USA: Mc Graw Hill
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. *Internet J Food Microbiology*, 71:1-20.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>