

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI
BEBERAPA JENIS *LACTOBACILLUS* DAN KOMBINASI BAKTERIOSIN DENGAN
ANTIBIOTIK STANDAR TERHADAP BAKTERI RESISTEN**

LAURENTIA VENITA KUSUMANINGRUM

Badan POM Pusat

e-mail: venitaku@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melihat aktivitas antibakteri *Lactobacillus brevis* FNCC 0021, *Lactobacillus delbrueckii* FNCC 0045, *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027, *Lactobacillus rhamnosus* FNCC 0052 serta kombinasi bakteriosin yang diisolasi dari *Lactobacillus* yang potensial dengan antibiotik standar terhadap mikroba resisten penyebab infeksi nosokomial, yaitu: *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistant (MDR), MRSA dan *Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococcus* (MRCNS). Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar untuk melihat luas zona hambatan yang muncul dan metode mikrodilusi untuk melihat nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan nilai konsentrasi bakterisida minimum (KBM). Sampel uji yang mempunyai daya hambat paling besar dilanjutkan dengan purifikasi parsial untuk memperoleh bakteriosin yang lebih murni. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri bakteriosin dan kombinasi bakteriosin dengan antibiotik standar yaitu: vankomisin, meropenem, tetrasiklin, dan siprofloksasin. Supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* memiliki aktivitas terhadap bakteri resisten. Supernatan kultur *L. brevis* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif relatif lebih besar diantara keempat sampel uji. Diameter zona hambat *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR, MRSA, dan MRCNS berturut-turut 11,2±0,15 mm, 12,0±0,23 mm dan 11,8±0,4 mm. KHM dan KBM supernatan *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR dan MRSA relatif sama yaitu 6,25% dan 12,5%. Sedangkan KBM dan KHM *L. brevis* terhadap MRCNS ialah 6,25%. Diameter zona hambat bakteriosin *L. brevis* dibandingkan supernatan *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR, berturut-turut sebesar 14,7±1,11 mm dan 11,2±0,65 mm. Kombinasi bakteriosin dengan antibiotik standar menghasilkan peningkatan KHM. Supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* MDR, MRSA dan MRCNS. Supernatan *L. brevis*, mempunyai aktivitas antibakteri lebih baik terhadap bakteri Gram negatif dibandingkan *Lactobacillus* lainnya. Bakteriosin diduga memiliki peran dalam aktivitas antibakteri supernatan *L. brevis*. Interaksi antara bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik tetrasiklin, siprofloksasin dan meropenem bersifat antagonis.

Kata Kunci: Antibakteri, Bakteriosin *L. brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, MRSA, MRCNS

ABSTRACT

This study aims to examine the antibacterial activity of *Lactobacillus brevis* FNCC 0021, *Lactobacillus delbrueckii* FNCC 0045, *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027, *Lactobacillus rhamnosus* FNCC 0052 and a combination of bacteriocins isolated from *Lactobacillus* that have potential with standard antibiotics against resistant microbes that cause nosocomial infections, namely: *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistant (MDR), MRSA and *Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococcus* (MRCNS). Antibacterial activity testing uses the agar diffusion method to see the area of the inhibitory zone that appears and the microdilution method to see the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (KBM). The test sample that has the greatest inhibitory power is continued with

partial purification to obtain a purer bacteriocin. Then the antibacterial activity of bacteriocins and the combination of bacteriocins with standard antibiotics, namely: vancomycin, meropenem, tetracycline and ciprofloxacin, were tested. The culture supernatants of *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, and *L. rhamnosus* have activity against resistant bacteria. *L. brevis* culture supernatant had relatively greater antibacterial activity against Gram-negative bacteria among the four test samples. The diameter of the inhibition zone for *L. brevis* against *P. aeruginosa* MDR, MRSA, and MRCNS was 11.2 ± 0.15 mm, 12.0 ± 0.23 mm and 11.8 ± 0.4 mm, respectively. The MIC and MIC of *L. brevis* supernatant against *P. aeruginosa* MDR and MRSA are relatively the same, namely 6.25% and 12.5%. Meanwhile, the KBM and MIC of *L. brevis* against MRCNS is 6.25%. The diameter of the inhibition zone of *L. brevis* bacteriocin compared to *L. brevis* supernatant against *P. aeruginosa* MDR was 14.7 ± 1.11 mm and 11.2 ± 0.65 mm, respectively. The combination of bacteriocins with standard antibiotics results in an increase in MIC. Culture supernatants of *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, and *L. rhamnosus* have antibacterial activity against *P. aeruginosa* MDR, MRSA and MRCNS. *L. brevis* supernatant has better antibacterial activity against Gram-negative bacteria than other *Lactobacillus*. Bacteriocins are thought to have a role in the antibacterial activity of *L. brevis* supernatants. The interaction between *L. brevis* bacteriocin and the antibiotics tetracycline, ciprofloxacin and meropenem is antagonistic.

Keywords: Antibacterial, *L. brevis* bacteriocin, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, MRSA, MRCNS

PENDAHULUAN

Resistensi bakteri adalah kemampuan bakteri untuk menetralkan dan melemahkan daya kerja antibiotik (PerMenKes, 2011). Berdasarkan data *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) pada tahun 2013 tentang ancaman resistensi antibiotik di Amerika Serikat, menunjukkan bahwa mikroba resisten antibiotik memiliki pengaruh paling besar terhadap kesehatan masyarakat. Pada tahun 2009, Indonesia menduduki peringkat ke-8 dari 27 negara dengan beban *Mycobacterium Tuberculosis multidrug resistance* (TB-MDR) tertinggi di dunia. Resistensi antibiotik terkait dengan beberapa hal, antara lain: pemberian antibiotik oleh dokter, kualitas antibiotik, lama pemberian antibiotik, dan pengetahuan masyarakat tentang pemakaian antibiotik (Supriyanto, 2011).

Berkembangnya galur bakteri resisten, semakin meningkatkan kejadian infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial (INOS) ialah infeksi yang didapat oleh penderita ketika penderita dalam proses asuhan keperawatan di Rumah Sakit (Darmadi, 2008). Di rumah sakit, organisme yang sering ditemukan resisten antara lain adalah *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *coagulase-negative staphylococci*, dan strain multi-drug-resistant dari *Streptococcus pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Dwiprahasto, 2005).

Epidemiologi infeksi yang disebabkan oleh MRSA berubah sangat cepat. Resistensinya semakin berkembang, sehingga dibutuhkan alternatif pengobatan untuk penanganannya (Arias & Muray, 2009). Menurut NIAID (2013) bakteri *Staphylococcus*, termasuk MRSA, adalah salah satu penyebab paling umum dari infeksi. Sedangkan infeksi berat disebabkan *Pseudomonas aeruginosa multidrug resistance* (MDR) sebanyak 13%. Akibat munculnya penyakit karena bakteri resisten sehingga diperlukan pengembangan antibakteri baru.

Bakteri Asam Laktat (BAL) memproduksi metabolit antara lain berupa bakteriosin yang mempunyai aktifitas antimikroba. *Lactobacillus* merupakan BAL yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, melalui sekresi senyawa antibakteri seperti bakteriosin, asam laktat, dan peroksida (Du Toit, 1998, dan De Vuyst, 2001).

Penelitian terhadap bakteriosin dari BAL terus berkembang karena potensinya sebagai antibakteri berspektrum luas serta relatif lebih aman (Jack, 1995, Yakabe, 2009, dan Yusuf, Copyright (c) 2024 HEALTHY : Jurnal Inovasi Riset Ilmu Kesehatan

2013). Bahkan menurut Marshal, 2003, bakteriosin dapat bekerja secara selektif, aman, dan mampu mencegah atau menghambat resistensi dibandingkan senyawa antimikroba lain.

METODE PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel uji, karakterisasi bakteri uji dan sampel uji, pengujian sampel uji baik secara tunggal maupun kombinasi serta interaksi antar sampel uji sebagai antibakteri terhadap bakteri resisten antibiotik, serta konfirmasi metabolit yang berperan sebagai antibakteri.

Penelitian diawali dengan pengujian karakterisasi bakteri uji maupun sampel uji. Karakterisasi bakteri uji yang terdiri dari *P. aeruginosa* MDR, MRSA dan MRCNS meliputi pengujian morfologi bakteri, uji serologi, dan uji kepekaan antibiotik. Sedangkan karakterisasi sampel uji yang terdiri dari *Lactobacillus brevis* FNCC 0021, *Lactobacillus delbrueckii* FNCC 0045, *Lactobacillus plantarum* FNCC 002, dan *Lactobacillus rhamnosus* FNCC 0052 meliputi pengujian morfologi bakteri dan sifat biokimia untuk menegaskan kebenaran identitas spesies bakteri sampel uji. Pengumpulan sampel uji diawali dengan kultur isolat sampel uji pada kondisi optimum. Pengolahan sampel uji dilakukan dengan sentrifugasi dan penyaringan hasil kultur sampel uji menggunakan membran filter 0,22 µm untuk memperoleh supernatan kultur bebas sel. Kemudian dilanjutkan dengan purifikasi parsial sampel uji yang paling potensial menggunakan metode desorpsi-absorpsi sehingga diperoleh bakteriosin yang lebih murni.

Supernatan kultur sampel uji maupun bakteriosin diuji aktivitas antibakterinya terhadap isolat bakteri resisten yaitu MRSA, MRCNS, dan *P. aeruginosa* MDR. Skrining aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji difusi agar metode kirby-bauer modifikasi sumur. Penentuan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) supernatan kultur sampel uji dilakukan dengan metode mikrodilusi menggunakan plat mikro 96 sumur. Dari hasil uji mikrodilusi dipilih sampel uji dengan KHM paling rendah terhadap bakteri uji. Kemudian dilakukan pengujian lebih lanjut dengan penentuan nilai konsentrasi bakterisid minimum (KBM). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan secara tunggal maupun kombinasi dari supernatan kultur sampel uji serta kombinasi antara bakteriosin dengan antibiotik standar.

Pada MRSA dan MRCNS menggunakan antibiotik standar vankomisin, tetrasiklin dan siprofloksasin. Sedangkan antibiotik standar untuk *P. aeruginosa* MDR adalah meropenem, tetrasiklin dan siprofloksasin.

Aktivitas antibakteri supernatan kultur sampel uji dan bakteriosin kemudian dihitung kesetaraannya terhadap antibiotik pembanding menggunakan metode difusi agar. Pada bakteri Gram positif menggunakan antibiotik pembanding tetrasiklin, dan vancomisin, sedangkan untuk bakteri Gram negatif menggunakan meropenem.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengumpulan dan Pengolahan Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan empat macam BAL sebagai sampel uji yaitu *Lactobacillus brevis* FNCC 0021, *Lactobacillus delbrueckii* FNCC 0045, *Lactobacillus plantarum* FNCC 0027 dan *Lactobacillus rhamnosus* FNCC 0052.

B. Karakterisasi Sampel Uji

Sampel uji dikarakterisasi untuk mengetahui identitas spesies bakteri tersebut. Uji karakterisasi meliputi pemeriksaan morfologi bakteri dan pengujian sifat biokimia sampel uji (Prakash, 2011). Berdasarkan hasil karakterisasi menunjukkan bahwa spesies bakteri sampel uji adalah *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* dan *L. rhamnosus* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Uji Karakterisasi Bakteri Sampel Uji

Parameter/ Uji	<i>L. brevis</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Morfologi bakteri	Gram (+) batang	Gram (+) batang	Gram (+) batang	Gram (+) batang
Sifat Biokimia				
- Fermentasi laktosa	(+)	(+)	(+)	(+)
- Fermentasi manitol	(-)	(-)	(+)	(+)
- Fermentasi maltosa	(+)	(+)	(+)	(+)
- Fermentasi sakarosa	(-)	(+)	(-)	(+)
- Indol	(-)	(-)	(-)	(-)

Ket : (-) : Hasil negatif (+) : Hasil positif

Produksi kultur isolat sampel uji dilakukan dengan penanaman kultur dengan jumlah bakteri tertentu pada kondisi optimum. Hasil kultur isolat sampel uji kemudian diolah untuk memisahkan metabolit dengan sel produsernya. Pengolahan dilakukan dengan sentrifugasi dan filtrasi membran filter 0,22µm, sehingga diperoleh supernatan bebas sel yang selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas antibakteri.

Sebagaimana halnya sampel uji, karakterisasi juga dilakukan terhadap bakteri uji dan bakteri kontrol. Uji karakterisasi meliputi pemeriksaan morfologi bakteri, pengujian kepekaan terhadap antibiotik terutama untuk bakteri uji yang resisten, pertumbuhan pada media selektif, dan uji serologi. Berdasarkan hasil karakterisasi menunjukkan bahwa spesies bakteri uji adalah *P. aeruginosa* MDR, MRSA, dan MRCNS (Tabel 2).

Tabel 2 Hasil Uji Karakterisasi Bakteri Uji

Bakteri Uji	Parameter/Uji	Hasil
<i>P. aeruginosa</i> MDR	Morfologi bakteri	Gram (-) batang
	Uji Kepekaan Antibiotik*	Isolat hanya sensitif terhadap meropenem (28 mm) dan resisten terhadap gentamisin, sefotaksim, sefazolin, siprofloksasin, levofloksasin, cefepim, ampicilin-sulbaktam, trimetoprim-sulfametoksazol, sefoperazon, sefadroksil, dan ceftazidim (0 mm).
MRSA	Morfologi bakteri	Gram (+) bulat
	Media selektif (MSA)	Manitol fermenter
	Uji koagulase plasma	Positif
	Uji kepekaan antibiotik	Antibiotik : sefoksitin 30µg Resistan (0 mm)
MRCNS	Morfologi bakteri	Gram (+) bulat
	Media selektif (MSA)	Non manitol fermenter
	Uji koagulase plasma	Negatif
	Uji kepekaan antibiotik	Antibiotik : sefoksitin 30µg Resistan (9 mm)

Ket : * Uji dilakukan oleh Lab. UPF Patologi Klinik RSUP Dr.Hasan Sadikin

Menurut hasil karakterisasi, bakteri uji merupakan bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik standar. Menurut Mariorakos (2011) bakteri multi drug resisten merupakan bakteri yang resisten terhadap 3 atau lebih golongan antibiotik yang secara normal bakteri tersebut bersifat peka. Bisa juga didefinisikan untuk bakteri yang resisten terhadap 1 golongan antibiotik kunci sehingga akan menunjukkan co-resistensi untuk antibiotik lainnya. Hasil pengujian kepekaan antibiotik pada isolat *P. aeruginosa* MDR menunjukkan sudah resisten terhadap 5 golongan antibiotik, yaitu: golongan aminoglikosida (gentamisin), sefalosporin (sefotaksim, sefazolin, sefepim, sefoperazon, sefadroksil, dan seftazidim), fluorokuinolon (siprofloksasin dan levofloksasin), inhibitor β -laktamase (ampisilin-sulbaktam), dan penghambat metabolisme folat (trimetoprim-sulfametoksazol).

Penentuan MRSA dan MRCNS sebagai bakteri resisten berdasarkan uji kepekaan terhadap sefoksitin 30 μ g yang menunjukkan diameter zona hambat ≤ 21 mm sehingga mengindikasikan keberadaan gen *mec-A* pada isolat bakteri uji (CLSI M100-S22, 2012). Pengujian aktivitas antibakteri dari masing-masing sample uji menggunakan 2 metode, yaitu metode difusi agar untuk melihat luas zona hambatan yang muncul dan metode mikrodilusi untuk melihat nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan nilai konsentrasi bakterisida minimum (KBM). Metode difusi agar untuk keempat sampel uji dilakukan secara tunggal, sedangkan metode mikrodilusi dilakukan secara tunggal maupun kombinasi dari keempat sampel uji. Selain itu juga dilakukan pengujian kombinasi untuk melihat sifat interaksi antar sample uji.

Jumlah produksi bakteri sampel uji terlebih dahulu diukur menggunakan spektrofotometer UV-visible dengan panjang gelombang 625 nm, sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Hal ini dilakukan untuk memperkirakan jumlah metabolit yang dihasilkan dari sampel uji. Berdasarkan hasil pengukuran, produksi jumlah bakteri sampel uji yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri setelah inkubasi rata-rata berada pada kisaran lebih dari $2,7 \times 10^9$ CFU/mL atau lebih dari 9 Mc farland (Tabel 3).

Tabel 3 Jumlah Produksi Bakteri Sampel Uji yang digunakan Pada Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sampel Uji	Jumlah bakteri (CFU/mL)		
	Uji Difusi Agar (tunggal)	Uji Mikrodilusi (Tunggal & Kombinasi)	Uji Interaksi Antar Sampel Uji
<i>L. brevis</i>	$2,84 \times 10^9$	$2,86 \times 10^9$	$2,83 \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i>	$2,87 \times 10^9$	$2,75 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$
<i>L. plantarum</i>	$2,77 \times 10^9$	$2,76 \times 10^9$	$2,92 \times 10^9$
<i>L. rhamnosus</i>	$2,74 \times 10^9$	$2,74 \times 10^9$	$2,82 \times 10^9$

C. Pengujian Aktivitas Antibakteri

1. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar serta Penentuan KHM dan KBM dengan Metode Mikrodilusi Terhadap Bakteri Gram Positif

Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan kultur sampel uji terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5

Supernatan kultur sampel uji mempunyai aktivitas antibakteri untuk bakteri uji Gram positif, baik bakteri resisten yaitu MRSA dan MRCNS maupun terhadap bakteri kontrol MSSA dan *E. faecalis*.

Tabel 4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Positif

Bahan Uji	Diameter Zona Hambat (mm)			
	MRSA	MRCNS	MSSA	<i>E. faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	12,0 ± 0,23	11,8 ± 0,40	12,2 ± 0,49	13,3 ± 0,68
<i>L. delbrueckii</i>	12,2 ± 0,81	12,2 ± 1,27	11,9 ± 0,55	11,5 ± 0,39
<i>L. plantarum</i>	12,2 ± 1,19	13,6 ± 1,59	13,4 ± 1,48	12,0 ± 0,24
<i>L. rhamnosus</i>	12,2 ± 1,24	11,3 ± 0,73	12,4 ± 1,01	11,9 ± 1,05
Tetrasiklin	7,8 ± 0,70	36,2 ± 0,95	29,5 ± 0,25	37,4 ± 1,25
Vancomisin	19,9 ± 0,67	18,9 ± 0,90	20,5 ± 1,42	18,1 ± 0,31

Ket : Diameter sumur = 5 mm

L. brevis = Supernatan Kultur *L. brevis* konsentrasi 100%

L. delbrueckii = Supernatan Kultur *L. delbrueckii* konsentrasi 100%

L. plantarum = Supernatan Kultur *L. plantarum* konsentrasi 100%

L. rhamnosus = Supernatan Kultur *L. rhamnosus* konsentrasi 100%

Tetrasiklin = Tetrasiklin konsentrasi 100 µg/mL

Vancomisin = Vancomisin konsentrasi 100 µg/mL

Supernatan kultur *L. brevis* memiliki aktivitas antibakteri yang tertinggi terhadap *E. faecalis* yang merupakan bakteri kontrol sensitif terhadap metabolit sampel uji dengan zona hambat 13,3±0,68 mm. Sedangkan terhadap MRSA, MRCNS, dan MSSA berturut-turut 12,0±0,23 mm, 11,8±0,40 mm, dan 12,2±0,49 mm. Sementara supernatan kultur *L. delbrueckii* memiliki aktivitas antibakteri yang relatif sama terhadap MRSA 12,2±0,81mm dan MRCNS 12,2±1,27 mm sedangkan terhadap MSSA, dan *E. faecalis* berturut-turut 11,9±0,55 mm, dan 11,5±0,39 mm. Pada supernatan kultur *L. plantarum* memiliki aktivitas antibakteri tertinggi untuk MRCNS sebesar 13,6±1,59 mm, sedangkan terhadap MRSA, MSSA, dan *E. faecalis* berturut-turut 12,2±1,19 mm, 13,4±1,48 mm, dan 12,0±0,24 mm. Supernatan *L. rhamnosus* memiliki aktivitas antibakteri tertinggi pada MSSA sebesar 12,4±1,01 sedangkan untuk MRSA, MRCNS dan *E. faecalis* berturut-turut 12,2±1,24 mm, 11,3±0,73 mm dan 11,9±1,05 mm. Selanjutnya, dilakukan pengujian dengan metode mikrodilusi untuk memperoleh KHM dan KBM dari setiap supernatan sampel uji terhadap bakteri Gram positif.

Tabel 5 Nilai KHM dan KBM Aktivitas Antibakteri Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Positif

Bahan Uji	Nilai KHM dan KBM							
	MRSA		MRCNS		MSSA		<i>E. faecalis</i>	
	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)
<i>L. brevis</i>	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	25,0	12,5	25,0
<i>L. delbrueckii</i>	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5
<i>L. plantarum</i>	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
<i>L. rhamnosus</i>	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
Tetrasiklin	25 x 10 ⁻⁴	>25 x 10 ⁻⁴	0,05 x 10 ⁻⁴	0,1 x 10 ⁻⁴	0,2 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	6,25 x 10 ⁻⁴	12,5 x 10 ⁻⁴
Vancomisin	0,8 x 10 ⁻⁴	3,1 x 10 ⁻⁴	3,1 x 10 ⁻⁴	6,25 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻⁴

Siprofloksasin	25 x 10 ⁻⁴	25 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴
----------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Ket : L.b = Supernatan Kultur *L. brevis*

L.d = Supernatan Kultur *L. delbrueckii*

L.p = Supernatan Kultur *L. plantarum*

L.r = Supernatan Kultur *L. rhamnosus*

Nilai KHM dan KBM antibiotik pembanding dinyatakan dalam g/100mL (%)

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi bertujuan untuk memperoleh nilai KHM supernatan kultur sampel uji. Nilai KHM dan KBM *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* terhadap MRSA relatif sama sebesar 6,25%, dan 12,5%. Sedangkan supernatan *L. brevis*, dan *L. delbrueckii* terhadap MRCNS mempunyai nilai KHM dan KBM yang sama yaitu sebesar: 6,25 %. Pada supernatan *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* terhadap MSSA memiliki KHM dan KBM 6,25% dan 12,5%. Sedangkan supernatan *L. brevis* memiliki nilai KHM dan KBM sebesar 6,25 % dan 25% terhadap MSSA. Pada supernatan *L. brevis* memiliki nilai KHM dan KBM sebesar 12,5 % dan 25% terhadap *E. faecalis*.

2. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar serta Penentuan KHM dan KBM dengan Metode Mikrodilusi Terhadap Bakteri Gram Negatif

Berikut ini merupakan hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan kultur sampel uji terhadap bakteri Gram negatif, dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Negatif

Bahan Uji	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>P. aeruginosa</i> MDR	<i>P. aeruginosa</i>
<i>L. brevis</i>	11,2 ± 0,65	14,2 ± 0,76
<i>L. delbrueckii</i>	11,0 ± 0,31	12,7 ± 0,42
<i>L. plantarum</i>	10,9 ± 0,53	12,3 ± 0,64
<i>L. rhamnosus</i>	10,4 ± 0,47	11,1 ± 0,15
Tetrasiklin	11,3 ± 0,40	12,5 ± 0,06
Meropenem	34,7 ± 0,91	39,1 ± 0,51

Ket : Diameter sumur = 5 mm

L. brevis = Supernatan Kultur *L. brevis* konsentrasi 100%

L. delbrueckii = Supernatan Kultur *L. delbrueckii* konsentrasi 100%

L. plantarum = Supernatan Kultur *L. plantarum* konsentrasi 100%

L. rhamnosus = Supernatan Kultur *L. rhamnosus* konsentrasi 100%

Tetrasiklin = Tetrasiklin konsentrasi 100 µg/mL

Meropenem = Meropenem konsentrasi 100 µg/mL

Hasil pengujian pada bakteri uji Gram negatif menunjukkan bahwa supernatan kultur sampel uji memiliki aktivitas antibakteri baik untuk *P. aeruginosa* MDR sebagai bakteri uji yang resisten maupun terhadap *P. aeruginosa* sebagai bakteri kontrol. Keempat supernatan kultur sampel uji menunjukkan aktivitas antibakteri yang relatif sama, tetapi untuk supernatan *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa* menunjukkan zona hambat tertinggi yaitu berturut-turut 11,2±0,65 mm dan 14,2±0,76 mm.

Nilai KHM dan KBM terhadap bakteri Gram negatif selanjutnya ditentukan dengan pengujian aktivitas antibakteri metode mikrodilusi, secara lengkap terlihat pada Tabel 7

Tabel 7 Nilai KHM dan KBM Aktivitas Antibakteri Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Negatif

Bahan Uji	Nilai KHM dan KBM			
	<i>P. aeruginosa</i> MDR		<i>P. aeruginosa</i>	
	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)
<i>L. brevis</i>	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>L. delbrueckii</i>	6,25	12,5	6,25	6,25
<i>L. plantarum</i>	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>L. rhamnosus</i>	6,25	12,5	6,25	12,5
Tetrasiklin	$12,5 \times 10^{-4}$	$>25 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	25×10^{-4}
Meropenem	$0,2 \times 10^{-4}$	$0,8 \times 10^{-4}$	$0,04 \times 10^{-4}$	$0,2 \times 10^{-4}$
Siprofloksasin	25×10^{-4}	25×10^{-4}	$0,4 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-4}$

Ket : L.b = Supernatan Kultur *L. brevis*

L.d = Supernatan Kultur *L. delbrueckii*

L.p = Supernatan Kultur *L. plantarum*

L.r = Supernatan Kultur *L. rhamnosus*

Nilai KHM dan KBM antibiotik pembanding dinyatakan dalam g/100mL (%)

Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai KHM dan KBM supernatan kultur sampel uji rata-rata relatif sama hasilnya. Nilai KHM dan KBM supernatan kultur sampel uji baik terhadap *P. aeruginosa* MDR maupun *P. aeruginosa* semua relatif sama pada konsentrasi 6,25% dan 12,5%. Berbeda dengan nilai KHM dan KBM supernatan kultur *L. delbrueckii* yang mempunyai konsentrasi paling tinggi yaitu sebesar 6,25% terhadap *P. aeruginosa*.

3. Penentuan KHM dan KBM Kombinasi Supernatan Sampel Uji Menggunakan Metode Mikrodilusi Terhadap Bakteri Gram Positif dan Negatif

Selanjutnya pengujian aktivitas antibakteri kombinasi supernatan kultur sampel uji dengan menggunakan metode mikrodilusi, terhadap semua bakteri uji tersebut. Supernatan yang dipergunakan merupakan supernatan tanpa pengenceran. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari kombinasi supernatan kultur sampel uji terhadap bakteri Gram positif sebagai berikut :

Tabel 8 Nilai KHM dan KBM Kombinasi Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Positif

Kombina si Bahan Uji	Nilai KHM dan KBM							
	MRSA		MRCNS		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)
L.b - L.d	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	25,0	12,5	25,0
L.b - L.p	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5
L.b - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
L.d - L.p	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
L.d - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
L.p - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5
Tetrasikli n	25×10^{-4}	$>25 \times 10^{-4}$	$0,05 \times 10^{-4}$	$0,1 \times 10^{-4}$	$0,2 \times 10^{-4}$	$0,8 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$12,5 \times 10^{-4}$

Vankomis	0,8 x	3,1 x	3,1 x	6,25 x	0,8 x	1,6 x		1,6 x
in	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Siprofloksasin	25 x	25 x	0,8 x	0,8 x	0,8 x	0,8 x		0,8 x
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴

Ket : L.b = Supernatan Kultur *L. brevis*

L.d = Supernatan Kultur *L. delbrueckii*

L.p = Supernatan Kultur *L. plantarum*

L.r = Supernatan Kultur *L. rhamnosus*

Nilai KHM dan KBM antibiotik pembanding dinyatakan dalam g/100mL (%)

Aktivitas antibakteri kombinasi antara supernatan kultur sampel uji tidak menunjukkan perbedaan bila dibandingkan dengan supernatan sampel uji secara tunggal. Hal ini ditunjukkan dengan nilai KHM dan KBM yang relatif stabil dan sama hasilnya antara kombinasi supernatan kultur sampel uji dengan supernatan kultur secara tunggal.

Tabel 9 menunjukkan nilai KHM dan KBM kombinasi supernatan kultur sampel uji terhadap bakteri Gram negatif. Hasil pengujian menunjukkan nilai KHM dan KBM kombinasi supernatan kultur sampel uji ternyata relatif sama dengan supernatan sampel uji tunggal, baik terhadap *P. aeruginosa* MDR maupun terhadap *P. aeruginosa*. Nilai KHM dan KBM kombinasi supernatan sampel uji berada pada konsentrasi 6,25% dan 12,5%. Kombinasi supernatan sampel uji yang terbaik ditunjukkan oleh kombinasi *L. brevis* – *L. delbrueckii* dan *L. brevis* - *L. plantarum* dengan nilai KHM dan KBM sebesar 6,25%.

Tabel 9 Nilai KHM dan KBM Kombinasi Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Bakteri Gram Negatif

Kombinasi Bahan Uji	Nilai KHM dan KBM			
	<i>P. aeruginosa</i> MDR		<i>P. aeruginosa</i>	
	KHM (%)	KBM (%)	KHM (%)	KBM (%)
L.b - L.d	6,25	12,5	6,25	6,25
L.b - L.p	6,25	12,5	6,25	6,25
L.b - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5
L.d - L.p	6,25	12,5	6,25	12,5
L.d - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5
L.p - L.r	6,25	12,5	6,25	12,5
Tetrasiklin	12,5 x 10 ⁻⁴	>25 x 10 ⁻⁴	6,25 x 10 ⁻⁴	25 x 10 ⁻⁴
Meropenem	0,2 x 10 ⁻⁴	0,8 x 10 ⁻⁴	0,04 x 10 ⁻⁴	0,2 x 10 ⁻⁴
Siprofloksasin	25 x 10 ⁻⁴	25 x 10 ⁻⁴	0,4 x 10 ⁻⁴	0,4 x 10 ⁻⁴

Ket: L.b = Supernatan Kultur *L. brevis*

L.d = Supernatan Kultur *L. delbrueckii*

L.p = Supernatan Kultur *L. plantarum*

L.r = Supernatan Kultur *L. rhamnosus*

Nilai KHM dan KBM antibiotik pembanding dinyatakan dalam g/100mL (%)

Hasil pengujian menunjukkan nilai KHM dan KBM kombinasi supernatan kultur sampel uji ternyata relatif sama dengan supernatan sampel uji tunggal, baik terhadap *P. aeruginosa* MDR maupun terhadap *P. aeruginosa*. Nilai KHM dan KBM kombinasi supernatan sampel uji berada pada konsentrasi 6,25% dan 12,5%. Kombinasi supernatan sampel uji yang terbaik ditunjukkan oleh kombinasi *L. brevis* – *L. delbrueckii* dan *L. brevis* - *L. plantarum* dengan nilai KHM dan KBM sebesar 6,25%.

D. Pengujian Interaksi Kombinasi Antar Sampel Uji

Pengujian interaksi antar sampel uji dilakukan untuk mengetahui hubungan interaksi antar sampel uji dengan cara membandingkan KHM kombinasi 2 *Lactobacillus* (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) dengan KHM masing-masing *Lactobacillus*. Sehingga dapat diketahui interaksi antar sampel uji bersifat sinergis, aditif ataupun antagonis. Sinergis, apabila KHM kombinasi 2 sampel uji (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) lebih kecil dari KHM sampel uji tunggal. Aditif, apabila tidak terdapat perbedaan KHM. Sedangkan antagonis jika KHM kombinasi 2 sampel uji (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) lebih besar dari KHM sampel uji tunggal. Berdasarkan metode tersebut, dapat diketahui sifat interaksi antar sampel uji, sebagai berikut:

Tabel 10 Sifat Interaksi Antar Sampel Uji Terhadap Bakteri Uji

Kombinasi Sampel Uji	Sifat Interaksi Terhadap Bakteri Uji				
	MRSA	MRCNS	MSSA	<i>P. aeruginosa</i> MDR	<i>P. aeruginosa</i>
L.b - L.d	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif
L.b - L.p	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif
L.b - L.r	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif
L.d - L.p	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif
L.d - L.r	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif
L.p - L.r	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif	Aditif

Ket: L.b = Supernatan Kultur *L. brevis*

L.d = Supernatan Kultur *L. delbrueckii*

L.p = Supernatan Kultur *L. plantarum*

L.r = Supernatan Kultur *L. rhamnosus*

Aditif = jika KHM kombinasi 2 sampel uji (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) = KHM sampel uji tunggal Konsentrasi supernatan 100%

Berdasarkan hasil pengujian KHM diperoleh nilai KHM kombinasi 2 sampel uji (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) relatif sama dengan KHM sampel uji tunggal. Oleh karena itu sifat interaksi antar sampel uji terhadap MRSA, MRCNS, MSSA, *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa* adalah aditif.

E. Aktivitas Bakteriosin *L. brevis* Hasil Purifikasi Parsial

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri sebelumnya, supernatan kultur *L. brevis* memiliki aktivitas yang paling baik terhadap bakteri Gram negatif, diantara supernatan kultur sampel uji lainnya. Oleh karena itu untuk *L. brevis* dilakukan purifikasi parsial dengan metode desorpsi-absorpsi agar diperoleh bakteriosin yang lebih murni.

Bakteriosin *L. brevis* kemudian dikarakterisasi untuk mengetahui sifat metabolitnya. Parameter yang diuji meliputi pengujian ketahanan terhadap panas dan pH yang kemudian diuji aktivitas penghambatannya pada bakteri uji (Tabel 11 dan Tabel 12).

Tabel 11 Hasil Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Panas Pada Bakteri Kontrol Sensitif Metabolit

Bakteri Kontrol	Suhu (°C)							
	K	40	50	60	70	80	90	100
<i>E. faecalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Ket : K= Kontrol; Bakteriosin *L. brevis* tanpa perlakuan

(+) = Bakteriosin *L. brevis* menghambat pertumbuhan bakteri kontrol

Hasil karakterisasi bakteriosin *L. brevis* menunjukkan bahwa bakteriosin merupakan senyawa yang tahan terhadap panas sampai suhu 100°C. Hal ini sesuai dengan studi yang dilakukan Ogunbanwo (2003) dan Mojgani (2008) yaitu bakteriosin yang berasal dari *L. brevis* tahan terhadap pemanasan sampai dengan suhu 121°C selama 60 menit. Demikian juga halnya dengan studi yang dilakukan Gautam (2009) yang menyatakan bakteriosin *L. brevis* tahan terhadap pemanasan pada suhu 100°C selama 20 menit ataupun suhu 121°C selama 10 menit. Berdasarkan hasil pengujian tersebut, bakteriosin *L. brevis* diduga termasuk dalam bakteriosin Kelas II yang tahan terhadap panas (*thermostabile*) (Malago, 2011).

Tabel 12 Hasil Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap pH Pada Bakteri Kontrol Sensitif Metabolit

Bakteri Kontrol	pH										
	K	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>E. faecalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Ket : K= Kontrol; bakteriosin *L. brevis* tanpa perlakuan

(+) = bakteriosin *L. brevis* menghambat pertumbuhan bakteri kontrol

(-) = bakteriosin *L. brevis* tidak menghambat pertumbuhan bakteri kontrol

Hasil uji ketahanan terhadap pH menunjukkan aktivitas penghambatan bakteriosin *L. brevis* terhadap bakteri kontrol hanya stabil pada pH asam yaitu 3-5, sedangkan pada pH ≥ 6 bakteriosin tidak menunjukkan aktivitas penghambatan lagi. Hal ini tidak sesuai dengan studi yang dilakukan Mojgani (2008) bahwa bakteriosin *L. brevis* mempunyai aktivitas antibakteri pada pH 4-6. Akan tetapi pengujian ini menunjukkan bahwa kondisi lingkungan seperti pH asam yang dihasilkan dari proses metabolisme BAL menunjang aktivitas antibakteri bakteriosin *L. brevis*.

Pengujian bakteriosin hasil purifikasi parsial akan diujikan hanya terhadap bakteri uji gram negatif yaitu *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa*. Selanjutnya dilakukan perbandingan daya antibakteri antara supernatan kultur *L. brevis* dengan bakteriosin *L. brevis* hasil purifikasi parsial.

Tabel 13 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Difusi Agar Antara Bakteriosin Hasil Purifikasi *L. brevis* Dibandingkan dengan Supernatan Kultur *L. brevis*

Bakteri Uji	Diameter Zona Hambat (mm)	
	Supernatan <i>L. brevis</i>	Bakteriosin <i>L. brevis</i>
<i>P. aeruginosa</i> MDR	11,2 $\pm$ 0,65	14,7 $\pm$ 1,11
<i>P. aeruginosa</i>	11,4 $\pm$ 0,15	15,8 $\pm$ 0,31

Ket : Diameter sumur = 5 mm

Bakteriosin *L. brevis* = Bakteriosin hasil dari purifikasi parsial kultur *L. brevis* konsentrasi 100%

Supernatan *L. brevis* = Supernatan Kultur *L. brevis* konsentrasi 100%

Berdasarkan data diatas menunjukan bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan oleh bakteriosin *L. brevis* jauh lebih besar dibandingkan dengan kultur supernatan *L. brevis*. Besarnya diameter zona hambat bakteriosin *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa* berturut-turut 14,7 $\pm$ 1,11 mm dan 15,8 $\pm$ 0,31 mm. Sedangkan diameter zona hambat dari supernatan *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa* sebesar 11,2 $\pm$ 0,65

mm dan $11,4 \pm 0,15$ mm. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa bakteriosin memiliki peranan besar sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram negatif. Menurut Sears (2007) membran luar bakteri Gram negatif merupakan lapisan-rangkap fosfolipid yang mengandung lipopolisakarida (LPS). Pada pengujian ini, membran luar *P. aeruginosa* MDR dan *P. aeruginosa* rusak karena berinteraksi dengan bakteriosin yang bersifat asam ($\text{pH} \pm 4$). Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Haller (2001) bahwa pH rendah membuat lipid terlarut, sehingga memungkinkan bakteriosin masuk dalam membran sel dan mencapai sitoplasma bakteri. Menurut studi yang dilakukan Stevens (1991) dan Savadogo (2004) menyatakan bahwa bakteriosin BAL efektif pada bakteri Gram negatif apabila membran luarnya mengalami kerusakan. Demikian juga dengan studi oleh Yusuf (2013) bahwa bakteriosin yang diproduksi oleh BAL memiliki kecenderungan untuk menembus membran luar bakteri Gram negatif dalam kombinasi dengan faktor-faktor lain yang menambah antimikroba lingkungan.

Selanjutnya dilakukan pengujian ketahanan terhadap panas dan pH bakteriosin *L. brevis* terhadap bakteri uji, untuk mengkonfirmasi metabolit *L. brevis* yang memiliki peranan sebagai antibakteri.

Tabel 14 Hasil Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap Panas

Bakteri Uji	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)							
	K	40	50	60	70	80	90	100
<i>P. aeruginosa</i> MDR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRSA	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRCNS	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
MSSA	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Ket : K= Kontrol; Bakteriosin *L. brevis* tanpa perlakuan

(+) = Bakteriosin *L. brevis* menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri uji

Berdasarkan hasil pengujian diatas, bahwa metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri bersifat tahan terhadap panas (*thermostabile*), hal ini terlihat dari kemampuan penghambatan bakteri uji setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit.

Tabel 15 Hasil Uji Ketahanan Bakteriosin Terhadap pH

Bakteri Uji	pH										
	K	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P. aeruginosa</i> MDR	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>P. aeruginosa</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MRSA	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MRCNS	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MSSA	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>E. faecalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Ket : K= Kontrol; bakteriosin *L. brevis* tanpa perlakuan

(+) = bakteriosin *L. brevis* menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri uji

(-) = bakteriosin *L. brevis* tidak menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri uji

Hasil uji ketahanan terhadap pH menunjukkan bahwa metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri bekerja pada pH sekitar 3-5 dan kehilangan aktivitasnya pada $\text{pH} \geq 6$. Hal ini sesuai dengan studi oleh Haller (2001) yang menyatakan fermentasi BAL diikuti dengan penurunan pH karena produksi asam laktat dan asam-asam organik lainnya, merupakan faktor penting untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Berdasarkan hasil uji ketahanan terhadap suhu dan pH menunjukkan hasil yang sama dengan uji karakterisasi bakteriosin *L. brevis* yaitu mempunyai aktivitas antibakteri pada pH sekitar 3-5 dan bersifat tahan panas sampai dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 15 menit. Oleh karena itu dapat diduga bahwa metabolit yang mempunyai peran sebagai antibakteri adalah bakteriosin.

F. Pengujian Interaksi Kombinasi Bakteriosin *L.brevis* dengan Antibiotik Standar

Interaksi kombinasi bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik standar, yaitu vankomisin, siprofloksasin, tetrasiklin dan meropenem. KHM kombinasi bakteriosin *L. brevis* dengan salah satu antibiotik standar (masing-masing ½ konsentrasi) dibandingkan dengan KHM bakteriosin *L. brevis* tunggal ataupun salah satu antibiotik standar. Nilai masing-masing KHM untuk pengujian interaksi kombinasi bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik standar, secara lengkap terlihat pada Tabel 16.

Tabel 16 Nilai KHM Kombinasi Bakteriosin *L.brevis* dengan Antibiotik Standar terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif

Kombinasi Bahan Uji	Nilai KHM (%Bakteriosin ; ppm Antibiotik)				
	MRSA	MRCNS	MSSA	<i>P. aeruginosa</i> MDR	<i>P. aeruginosa</i>
Bakt. L.b - Vanco	6,25 ; 0,8	3,1 ; 1,6	>6,25 ; >0,8	TD	TD
Bakt L.b Vankomisin	6,25 0,4	6,25 0,8	6,25 0,8	TD TD	TD TD
Bakt. L.b - Tetra	6,25 ; 25	6,25 ; 0,04	3,1 ; 0,1	3,1 ; 6,2	6,25 ; 6,25
Bakt L.b Tetrasiklin	6,25 12,5	6,25 0,02	6,25 0,05	6,25 3,1	6,25 3,1
Bakt. L.b - Sipro	6,25 ; 25	3,1 ; 0,4	3,1 ; 0,4	>6,25 ; >25	6,25 ; 0,4
Bakt L.b Siprofloksasin	6,25 12,5	6,25 0,2	6,25 0,2	6,25 12,5	6,25 0,1
Bakt. L.b – Mero	TD	TD	TD	>6,25 ; >0,2	>6,25 ; >0,04
Bakt L.b Meropenem	TD TD	TD TD	TD TD	6,25 0,2	6,25 0,04

Ket: Bakt. L.b = bakteriosin *L. brevis*
Bakt. L.b-Vanco = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* - vankomisin
Bakt. L.b-Tetra = Kombinasi bakteriosin *L.brevis* - tetrasiklin
Bakt. L.b-Sipro = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* – ciprofloksasin
Bakt. L.b- Mero = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* – meropenem
TD = Tidak Dilakukan
Konsentrasi bakteriosin *L. brevis* 100%
Konsentrasi Antibiotik Standar 100 µg/mL

Peningkatan nilai KHM menunjukkan penurunan aktivitas sampel uji

Berdasarkan data-data tersebut, maka diperoleh profil sifat interaksi kombinasi antara bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik standar, sebagaimana terlihat pada Tabel 17

Tabel 17 Profil Sifat Interaksi Bakteriosin *L. brevis* dengan Antibiotik Standar

Kombinasi Sampel Uji	Sifat Interaksi Terhadap Bakteri Uji				
	MRSA	MRCNS	MSSA	<i>P. Aeruginosa</i> MDR	<i>P. Aeruginosa</i>
Bakt. L.b - Vanco	Antagonis	Antagonis	Antagonis	TD	TD
Bakt. L.b - Tetra	Antagonis	Antagonis	Antagonis	Antagonis	Antagonis
Bakt. L.b - Sipro	Antagonis	Antagonis	Antagonis	Antagonis	Antagonis
Bakt. L.b - Mero	TD	TD	TD	Antagonis	Antagonis

Ket: Bakt. L.b-Vanco = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* - vankomisin

Bakt. L.b-Tetra = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* - tetrasiklin

Bakt. L.b-Sipro = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* - ciprofloksasin

Bakt. L.b- Mero = Kombinasi bakteriosin *L. brevis* - meropenem

TD = Tidak Dilakukan

Antagonis = jika KHM kombinasi bakteriosin *L. brevis* dengan salah satu antibiotik (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) > KHM bakteriosin *L. brevis* atau antibiotik standar tunggal

Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan bahwa KHM kombinasi bakteriosin *L. brevis* dengan salah satu antibiotik (masing-masing $\frac{1}{2}$ konsentrasi) > KHM bakteriosin *L. brevis* atau KHM antibiotik standar tunggal. Sehingga dapat diketahui bahwa sifat interaksi antara bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik standar tetrasiklin, siprofloksasin, vankomisin dan meropenem terhadap bakteri gram positif dan gram negatif, bersifat antagonis. Merupakan hal yang menarik karena bakteriosin *L. brevis* bersifat antagonis terhadap antibiotik standar baik yang bersifat bakteriostatik yaitu tetrasiklin maupun antibiotik yang bekerja bakterisid yaitu vankomisin, meropenem dan siprofloksasin. Berdasarkan Wattimena (1991) sifat antagonis tetrasiklin terjadi karena asam dan basa kuat dapat menyerang tetrasiklin yang mempunyai gugus OH pada C₆, hingga terjadi modifikasi cincin C sehingga aktifitasnya hilang. Maka pada saat tetrasiklin dikombinasikan dengan bakteriosin *L. brevis* yang memiliki pH asam (pH 3-5) menghasilkan interaksi antagonis. Merujuk Wattimena (1991) yang menyatakan bahwa kombinasi antibiotik bakterisid dengan bakteriostatik adalah antagonis bila kuman peka terhadap antibiotik bakterisid, maka muncullah dugaan bahwa bakteriosin *L. brevis* bersifat bakteriostatik. Oleh karena itu pada saat dikombinasikan dengan antibiotik yang bersifat bakterisid maka menghasilkan interaksi antagonis. Hal ini terjadi pada interaksi bakteriosin *L. brevis* dengan vancomisin, meropenem dan siprofloksasin. Bakteriosin dari BAL bersifat bakteriostatik, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Upreti dan Hindill (1975) yang menyatakan bahwa bakteriosin *L. helveticus* bersifat bakteriostatik berdasarkan sintesis makromolekulnya. Demikian juga dengan studi oleh Hernandez (2005) dan Kerr (2013) bahwa bakteriosin *L. plantarum* mempunyai aksi bakteriostatik.

G. Kesetaraan Aktivitas Antimikroba Sampel Uji dan Bakteriosin *L. brevis* terhadap Antibiotik Pembanding

Penentuan kesetaraan aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan metode difusi agar dengan sumuran. Metode difusi agar merupakan metode kualitatif untuk kesetaraan aktivitas antibakteri menemukan konsentrasi supernatan kultur dan bakteriosin *L. brevis* yang menghasilkan diameter hambat yang berada dalam rentang diameter hambat antibiotik pembanding. Kemudian dibuat grafik antara logaritma konsentrasi antibiotik pembanding terhadap diameter hambat sebagai kurva kalibrasi. Antibiotik pembanding yang digunakan adalah vankomisin, meropenem maupun tetrasiklin.

Pada bakteri uji Gram positif, kesetaraan aktivitas antibakteri supernatan kultur dan bakteriosin *L. brevis* dibandingkan terhadap vankomisin untuk MRSA dan MSSA, sedangkan untuk MRCNS dibandingkan terhadap tetrasiklin. Data persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi dan kesetaraan terhadap antibiotik pembanding pada bakteri Gram positif dapat dilihat pada Tabel 18 dan Tabel 19

Tabel 18 Persamaan Regresi Linear Dari Kurva Kalibrasi Dan Kesetaraan Terhadap Antibiotik Pembanding Pada Bakteri Gram Positif

Bakteri Uji	Antibiotik Pembanding	Persamaan Regresi Linear	Koefisien Korelasi (R/r ²)
MRSA	Vankomisin	$y = 12,001x + 50,786$	0,9801
MRCNS	Tetrasiklin	$y = 10,568x + 61,366$	0,9898
MSSA	Vankomisin	$y = 8,1531x + 38,51$	0,9807

Ket: y = diameter hambat
x = log konsentrasi

Tabel 19 Kesetaraan Aktivitas 50 µL dari 100% Supernatan Kultur Sampel Uji terhadap Antibiotik Pembanding pada Bakteri Gram Positif

Bakteri Uji	Antibiotik Pembanding	Sampel Uji	Kesetaraan Aktivitas Terhadap Antibiotik pembanding (µg)
MRSA	Vankomisin	L.b	0,590
		L.d	0,610
		L.p	0,610
		L.r	0,610
MRCNS	Tetrasiklin	L.b	0,020
		L.d	0,022
		L.p	0,030
		L.r	0,018
MSSA	Vankomisin	L.b	0,593
		L.d	0,545
		L.p	0,832
		L.r	0,627

Ket : L.b = Supernatan kultur *L. brevis*
L.d = Supernatan kultur *L. delbrueckii*
L.p = Supernatan kultur *L. plantarum*
L.r = Supernatan kultur *L. rhamnosus*
Bakteriosin L.b = Bakteriosin hasil purifikasi parsial *L. brevis*

Nilai kesetaraan aktivitas antibakteri dihitung dengan memasukkan diameter hambat supernatan kultur sampel uji ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh. Berdasarkan hasil perhitungan, pada MRSA aktivitas antibakteri 50 μ L dari 100% supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* berturut-turut setara dengan 0,59 μ g, 0,61 μ g, 0,61 dan 0,61 μ g vankomisin. Pada MRCNS, aktivitas antibakteri 50 μ L dari 100% supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* berturut-turut setara dengan 0,020 μ g, 0,0223 μ g, 0,0302 dan 0,0183 μ g tetrasiklin. Pada MSSA aktivitas antibakteri 50 μ L dari 100% supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* berturut-turut setara dengan 0,593 μ g, 0,545 μ g, 0,832 μ g dan 0,627 μ g vankomisin.

Pada bakteri uji Gram negatif, uji kesetaraan aktivitas antibakteri supernatan kultur sampel uji dan bakteriosin *L. brevis* menggunakan antibiotik pembanding meropenem. Data persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi dan kesetaraan terhadap antibiotik pembanding pada bakteri Gram negatif dapat dilihat pada Tabel 20 dan Tabel 21

Tabel 20 Persamaan Regresi Linear Dari Kurva Kalibrasi Dan Kesetaraan Terhadap Antibiotik Pembanding Pada Bakteri Gram Negatif

Bakteri Uji	Antibiotik Pembanding	Persamaan Regresi Linear	Koefisien Korelasi (R/r ²)
<i>P.aeruginosa</i> MDR	Meropenem	$y = 13,172x + 57,867$	0,9957
<i>P.aeruginosa</i>	Meropenem	$y = 10,93x + 61,037$	0,9902

Ket: y = diameter hambat
x = log konsentrasi

Tabel 21 Kesetaraan Aktivitas 50 μ L dari 100% Supernatan Kultur Sampel Uji dan Bakteriosin *L. brevis* terhadap Antibiotik Pembanding Pada Bakteri Gram Negatif

Bakteri Uji	Antibiotik Pembanding	Sampel Uji	Kesetaraan aktivitas terhadap Antibiotik pembanding (μ g)
<i>P.aeruginosa</i> MDR	Meropenem	L.b	0,286
		L.d	0,277
		L.p	0,272
		L.r	0,249
		Bakteriosin L.b	0,528
<i>P.aeruginosa</i>	Meropenem	L.b	0,052
		L.d	0,038
		L.p	0,035
		L.r	0,027
		Bakteriosin L.b	0,073

Ket : L.b = Supernatan kultur *L. brevis*
L.d = Supernatan kultur *L. delbrueckii*
L.p = Supernatan kultur *L. plantarum*
L.r = Supernatan kultur *L. rhamnosus*
Bakteriosin L.b= Bakteriosin hasil purifikasi parsial *L. brevis*

Pada bakteri uji *P. aeruginosa* MDR aktivitas antibakteri 50 µL dari 100% supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* berturut-turut setara dengan 0,286 µg, 0,277 µg, 0,272 µg, dan 0,249 µg meropenem. Sedangkan aktivitas antibakteri 50 µL dari 100% bakteriosin *L. brevis* setara dengan 0,528 µg meropenem. Pada bakteri uji *P. aeruginosa* sebagai bakteri kontrol Gram negatif aktivitas antibakteri 50 µL dari 100% supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* berturut-turut setara dengan 0,052 µg, 0,038 µg, 0,035 µg, dan 0,027 µg meropenem. Aktivitas antibakteri 50 µL dari 100% bakteriosin dari *L. brevis* setara dengan 0,073 µg meropenem.

KESIMPULAN

Supernatan kultur *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, dan *L. rhamnosus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* MDR, MRSA dan MRCNS. Interaksi kombinasi antar sampel uji terhadap bakteri resisten tersebut menunjukkan sifat aditif. Supernatan *L. brevis*, mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif yang relatif lebih besar dibandingkan sampel uji lainnya, sehingga dilanjutkan purifikasi parsial dengan metode desorpsi-absorpsi supaya memperoleh bakteriosin yang lebih murni. Aktivitas antibakteri bakteriosin *L. brevis* lebih besar dibandingkan dengan aktivitas supernatan *L. brevis* terhadap *P. aeruginosa* MDR. Interaksi antara bakteriosin *L. brevis* dengan antibiotik standar yaitu vankomisin, meropenem, tetrasiklin dan siprofloksasin bersifat antagonis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alekshun, M. N., dan Levy, S. B. (2007) : Molecular Mechanism of Antibacterial Multidrug Resistance, Review. *Cell.*, 128, 1037-1049
- Barbara, S. (2010) : *Diseases and Disorder MRSA*, Cengage Learning, Farmington Hills, 14-27
- Bergeron, L.J., Bermudez, E.M dan Burne, R.A. (2000) : Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45, *J. of Biotechnology*, 182(13), 3649-3654
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Morse, S.A. (2004) : *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, The McGraw-Hill Companies, Inc., 23th Edition, New York, 163-315
- Center for Disease Control and Prevention (2013) : *Antibiotic Resistance Threats In The United States 2013*, U.S. Departement of Health & Human Services, <http://www.cdc.gov/oid/BSC.html>, diakses tanggal 22 Mei 2014
- Darmadi (2008) : *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya*, Penerbit Salemba Medika, 8-14
- Dhewa, T. (2012) : Screening, Production Purification and Potential Use of Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria of Meat and Dairy Food Origin, *International Conference on Nutrition and Food Sciences (IPCBE)*, 39, 35-41
- Dwiprahasto, I. (2005) : Kebijakan Untuk Meminimalkan Risiko Terjadinya Resistensi Bakteri di Unit Perawatan Intensif Rumah Sakit, *JMPK*, 08 (04), 177-181
- Ducel, G. (2002) : *Prevention of Hospital-Acquired Infections, A practical Guide*. 2nd Edition, New York: Department of Communicable disease, Surveillance and Response, 107-109.
- Gautam, N. dan Sharma, N. (2009) : Purification and Characterization of Bacteriocin produced by strain of *Lactobacillus brevis* MTCC 7539, *Indian journal of Biochemistry & Biophysics*, 46, 337-341

- Eijssink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., dan Holo, H. (2002) : Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication, *Kluwer Academic Publisher*, 81, 639–654
- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M.G., Scerenbacher, P., Bode, C., dan Hammes, W.P. (2001) : Metabolic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in the Gastro-intestinal Ecosystem: A comparative *in vitro* Study Between Bacteria of Intestinal and Fermented Food Origin, *Science Direct, Systematic and Applied Microbiology*, 24, 218-226
- Hernandez, D., Cardell, E., dan Zarate, V. (2005) : Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711, *Journal of Applied Microbiology*, 99, 77–84
- Juuti., K. (2004): *Surface protein PIs of methicillin-resistant Staphylococcus aureus Role in Adhesion, Invasion and Pathogenesis, and Evolutionary Aspects*, Dissertation in General Microbiology, J. Academic, 2-5
- Kerr, A.P. (2013) : *The Bacteriostatic Spectrum and Inhibitory Mechanism of Glycocin F, a Bacteriocin from Lactobacillus Plantarum KW 30*, Thesis Master of Science in Microbiology, Massey University, Palmerston North, 61-80
- Levinson, W., dan Jawetz, E. (2002) : *Medical Microbiology & Immunology : Examination & Board Review*, McGraw-Hill, 6th Edition, New York, 91-92
- Lolans, K., Villegas, V.M., dan Quinn, J.P. (2008) : *Antimicrobial Resistance Problem Pathogens and Clinical Counter Measures*, Informa Healthcare, London, 149-160
- Luellmann, H., Hein, L., Mohr, K., dan Bieger, D. (2005) : *Color Atlas of Pharmacology*, Thieme, 3rd Edition, New York, 268-283
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, dan J. Parker. (2003): *Biology of Microorganism*, 10th Edition, Pearson Education, London, 704-705, 741-742.
- Malago, J.J, Koninkx, J.F.J.G., dan Logar, R.M. (2011) : *Probiotic, Bacteria and Enteric Infections*, Springer Science + Business Media, 4-24; 314-317; 393-396
- Mariorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., dan Monnet, D.L. (2011) : Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin Microbiol Infect*, 18, 268-281
- Malago, J.J, Koninkx, J.F.J.G., dan Logar, R.M. (2011) : *Probiotic, Bacteria and Enteric Infections*, Springer Science + Business Media, 4-24; 314-317; 393-396
- Marshall, S.H., (2003) : Antimicrobial Peptides: As Natural Alternative to Chemical Antibiotics And a Potential for Applied Biotechnology, *Electron J Biotechno*, (6) 2, 3-6
- Mulvey, M.R., dan Simor, A.E. (2009) : Antimicrobial Resistance in Hospital : How Concerned should we be?, *Can Med Assoc J.*, 408-414
- Neal, J. (2005) : *Medical Pharmacology at Glance*, 5th Edition, Blackwell Publishing Ltd, New Jersey, 80-85
- Oakey, L., Carroll, K., McClean, S., Keller, F., Costello, M., dan Behan, J. (2000) : Antimicrobial peptide-alternative to antibiotics?. Institute of Technology Tallaght, Dublin
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., dan Onilude, A.A. (2003) : Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, *African Journal of Biotechnology*, 2 (8), 219-227

- Palavecino, E. (2007) : *Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Infections*, Humara press Inc., New Jersey, 39-47
- Pitingore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F., dan Nader-Macias, M. E., (2007) : Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 557-568
- Prakash, B., Shekar, M., dan Karunasagar, I. (2011) : Evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus* species associated with dentures, *Biotechnol. Bioinf. Bioeng. Society for Applied Biotechnology*, (1) 2, 235-239
- Prescott, Lansing, M., dan Harley, J.P. (2003): *Microbiology*, 5th Edition, The McGraw Hill Companies, Inc., New York, 529-532
- Reed, K.D., Stemper, M.E., dan Shukla, S.K (2007) : *MRSA Case Studies*, Humara press Inc., New Jersey, 21-27
- Republik Indonesia (2011) : Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/MENKES/PER/XII/2011 Tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, Berita Negara RI No.874, 2011, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Restiati, A. (2014) : Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Kultur *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Lactobacillus casei* Terhadap Bakteri Resisten, Tesis, Institut Teknologi Bandung, 24-25
- Satari, M.H. (2002) : Fenomena Molekuler Enzim betalaktamase *S. Aureus* resisten ampicilin Sulbaktam, Desertasi, Universitas Padjadjaran, 14-23
- Savadogo, A., Outtara, C.A.T., Bassole, I.H.N., dan Traore, A.S. (2004) : Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk, *Pakistan Journal of Nutrition* (3) 3, 174-179
- Sears, B.W., Spear, L., dan Saenz, R. (2007) : *Hardcore Microbiology and Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins, Chicago, 1-3
- Spicer, J.W. (2008) : *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Elsevier Limited, 2nd Edition, Philadelphia, 218-219
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. (1991) : Nisin Treatment for Inactivation of *Salmonella* Species and Other Gram-Negative Bacteria, *American Society for Microbiology*, (57) 12, 3613-3615
- Supriyanto (2011) : 7th National Symposium of Indonesia Antimicrobial Resistance Watch, *Cermin Dunia Kedokteran*, (38) 6, 474
- Upreti, G.C. dan Hinsdill, R.D. (1975) : Production and Mode of Action of Lactocin 27: Bacteriocin from a Homofermentative *Lactobacillus*, *Antimicrob Agents Ch*, (7) 2, 139-145
- Usmiati, S., dan Rahayu, W.P. (2011) : Aktivitas Hambat Bubuk Ekstrak Bakteriosin Dari *Lactobacillus* sp. Galur SCG 1223, *Prosiding Pada Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, PusLitBang Peternakan, 388-397
- Weigelt, J.A. (2007) : *MRSA*, Informa healthcare, New York, 21-42
- Zhenbo, X., Li, L. Z.X., Chu, J., Li, B., Shi, L., Su, J., dan Shirtliff, M.E. (2011) : Development and application of a novel multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of various types of staphylococci strains, *Afr J Microbiol Res*, 5(14), 1869-1873