

**KARAKTERISASI *Lactiplantibacillus plantarum*
MTA-3 SEBAGAI PROBIOTIK**

SKRIPSI

Oleh

VANIA NATASHA



**PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara megabiodiversitas yang memiliki kekayaan sumber daya hayati melimpah, baik dari flora, fauna, maupun mikroorganisme yang tersebar di berbagai ekosistem tropis. Salah satu jenis mikroorganisme yang dapat ditemukan pada sumber daya hayati di Indonesia adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup di berbagai tempat yang beragam, seperti saluran pencernaan, tanaman, produk olahan makanan, produk susu, serta produk fermentasi (Ardilla *et al.*, 2022). BAL mampu menghasilkan asam laktat sebagai produk utama metabolisme serta mampu menghambat pertumbuhan patogen melalui produksi senyawa antimikroba seperti bakteriosin. BAL dapat menghasilkan senyawa-senyawa tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain, seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, dan diasetil (Datta *et al.*, 2019).

Lactiplantibacillus plantarum merupakan salah satu spesies bakteri asam laktat yang paling fleksibel secara metabolik dan memiliki adaptabilitas ekologis yang tinggi. *Lactiplantibacillus plantarum* dapat ditemukan di berbagai sumber, termasuk produk fermentasi pangan, saluran pencernaan manusia, dan tanaman. Penelitian oleh Rochetti *et al.* (2021) menunjukkan bahwa strain *L. plantarum* memiliki karakter probiotik yang kuat, sehingga dapat dikomersialkan sebagai

suplemen penunjang kesehatan dan produk pangan fungsional. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat kesehatan pada inang melalui perbaikan keseimbangan mikrobial dalam saluran pencernaan. Efektivitas agen probiotik sangat bergantung pada kemampuannya untuk bertahan hidup melewati kondisi ekstrem, seperti paparan asam lambung dengan pH rendah dan garam empedu di usus halus (Hu *et al.*, 2026).

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian Anugrahillah (2024) yang telah berhasil mengisolasi empat isolat bakteri asam laktat, yaitu MTA-1, MTA-2, MTA-3, dan MTA-4. Penelitian sebelumnya telah mengidentifikasi isolat secara fenotipik, namun karakteristik probiotik masing-masing isolat belum dievaluasi secara komprehensif. Isolat BAL dari buah matoa (*Pometia pinnata*) memiliki karakteristik yang khas, seperti mampu tumbuh pada pH dan suhu ekstrem, serta menghasilkan eksopolisakarida. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan pada evaluasi potensi probiotik isolat *Lactiplantibacillus plantarum* MTA-3 melalui pengujian resistensi terhadap pH *gastrointestinal*, garam empedu, autoagregasi, hidrofobisitas permukaan sel, aktivitas antimikroba, serta aktivitas antioksidan. Penelitian oleh Cao *et al.* (2026) menggunakan *strain L. plantarum* dari cuka dedak gandum (*Cupei*) yang secara *in vitro* mengevaluasi karakteristik probiotik dan fitur fungsionalnya. Penelitiannya menunjukkan bahwa BAL tersebut memiliki kemampuan untuk beradaptasi pada saluran pencernaan, empedu, aktivitas antimikroba, sifat hidrofobisitas, serta kemampuan autoagregasi yang baik. Karakteristik ini menandakan BAL dari tanaman dapat dikembangkan menjadi salah satu agen probiotik yang bermanfaat bagi manusia.

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa *L. plantarum* memiliki potensi sebagai agen probiotik, namun karakteristik tersebut tidak dapat digeneralisasi untuk seluruh *strain* karena perbedaan sifat fisiologis dan kemampuan adaptasi setiap *strain*. Oleh karena itu, isolat *L. plantarum* MTA-3 perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui karakteristiknya sebagai salah satu jenis probiotik yang dapat bermanfaat bagi manusia melalui evaluasi potensi probiotik, pengujian sensitivitas terhadap antibiotik, serta evaluasi aktivitas antimikroba. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan probiotik berbasis sumber daya lokal, serta menjadi dasar dalam inovasi produk pangan fungsional yang mendukung peningkatan kesehatan masyarakat dan kemandirian pangan Indonesia.

1.2. Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik yang dimiliki oleh isolat *Lactiplantibacillus plantarum* MTA-3 sebagai salah satu bakteri yang berpotensi menjadi probiotik dan berpeluang dimanfaatkan oleh manusia, baik untuk mendukung kesehatan maupun untuk pengembangan fitur fungsional lainnya pada produk pangan. Manfaat dari penelitian ini adalah menyajikan informasi ilmiah yang lebih komprehensif mengenai potensi isolat *Lactiplantibacillus plantarum* MTA-3 sebagai kandidat probiotik yang unggul, sehingga dapat dimanfaatkan dalam pengembangan produk pangan fungsional serta mendukung peningkatan kesehatan manusia yang disajikan melalui analisis data secara deskriptif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok mikroorganisme fungsional dengan karakteristik umum berupa bakteri Gram-positif, tidak membentuk spora, berbentuk kokus atau batang (basil), serta memiliki metabolisme fermentatif terhadap karbohidrat yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama. BAL merupakan bakteri anaerob yang dapat hidup pada berbagai habitat yang luas di alam, seperti pada tanaman, saluran pencernaan, produk makanan kalengan, produk susu, serta produk fermentasi (Rahmiati dan Mumpuni, 2017). BAL diketahui mampu menghasilkan berbagai produk metabolisme yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri, misalnya asam organik, hidrogen peroksida, dan diasetil. BAL dikenal memiliki kemampuan memproduksi zat spesifik protein berupa bakteriosin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti genus *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, dan *Enterococcus* (Khader *et al.*, 2019).

Klasifikasi bakteri asam laktat pada awalnya didasarkan pada karakter morfologi sel, kemampuan memfermentasi glukosa, serta rentang suhu pertumbuhannya, sehingga BAL dikelompokkan ke dalam beberapa genus utama, yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Perbedaan antar-BAL tidak hanya ditentukan oleh bentuk sel dan pola fermentasi, tetapi juga

oleh kemampuan metaboliknya dalam menghasilkan asam organik, eksopolisakarida, senyawa antimikroba, serta komponen pembentuk cita rasa yang berperan penting dalam proses fermentasi pangan. Oleh karena itu, BAL telah banyak dimanfaatkan sebagai kultur starter, kultur pelindung, maupun kandidat probiotik (Bintsis, 2018). Seiring dengan perkembangan metode molekuler dan analisis genom, dasar klasifikasi BAL semakin berkembang, sehingga identifikasi tidak lagi hanya bergantung pada karakter fenotipik, tetapi juga mempertimbangkan hubungan kekerabatan genetik antarspesies. Beberapa spesies yang sebelumnya dikategorikan ke dalam genus *Lactobacillus* diketahui memiliki keragaman genetik yang sangat besar, sehingga kemudian direklasifikasi ke dalam beberapa genus baru, seperti *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Levilactobacillus*, dan genus lainnya (Zheng *et al.*, 2020). Strain BAL umumnya dapat berpotensi sebagai probiotik yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan apabila dikonsumsi dalam takaran yang cukup.

2.2. Potensi Probiotik *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum merupakan salah satu spesies bakteri asam laktat (BAL) yang paling serbaguna dan banyak dipelajari karena kemampuannya beradaptasi di berbagai relung ekologi, mulai dari produk fermentasi nabati, daging, hingga saluran pencernaan manusia. *L. plantarum* dapat digunakan dalam pembuatan produk probiotik berupa produk pangan fungsional karena dapat menghasilkan asam laktat yang dapat dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan saluran pencernaan (Refi *et al.*, 2026). Sebagai agen probiotik, strain

Lactiplantibacillus plantarum ZG308 memiliki toleransi yang baik khususnya pada saluran pencernaan, adhesi pada sel epitel usus, dan aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme yang berpotensi berbahaya (Cao *et al.*, 2026). Karakteristik fungsional utamanya meliputi kemampuan adhesi yang kuat pada sel epitel inang, yang memungkinkan pembentukan barier protektif terhadap kolonisasi patogen melalui mekanisme eksklusi kompetitif dan produksi senyawa antimikroba seperti bakteriosin dan asam organik.

Potensi probiotik *Lactiplantibacillus plantarum* perlu dikaji pada tingkat strain karena kemampuan bertahan hidup, berkolonisasi, dan memberikan efek fungsional pada inang dapat berbeda antar-strain. Penelitian yang dilakukan oleh Sun *et al.* (2022) mengisolasi bakteri *L. plantarum* dari berbagai makanan fermentasi tradisional Tiongkok dan menemukan 4 strain yang memiliki performa probiotik terbaik berdasarkan pengujian ketahanan terhadap asam, ketahanan terhadap garam empedu, serta aktivitas antibakteri. Penelitian lokal oleh Manurung *et al.* (2024) juga menunjukkan bahwa strain *L. plantarum* Dad-13 yang berasal dari dadih, yang kemudian dikonsumsi melalui susu fermentasi terbukti mampu bertahan di saluran pencernaan sehingga dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik.

2.3. Karakteristik Probiotik *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum merupakan bakteri asam laktat yang mampu beradaptasi pada saluran cerna, yang sebagai probiotik dikenal memiliki fleksibilitas ekologis dan metabolik yang tinggi. Isolat *L. plantarum* secara umum

memiliki kemampuan untuk bertahan pada kondisi asam lambung, toleran terhadap garam empedu, serta memiliki kemampuan adhesi pada epitel usus. Bakteri ini teridentifikasi sebagai salah satu jenis probiotik yang memiliki toleransi yang tinggi terhadap pH rendah dan garam empedu dari sekresi hati pada saluran pencernaan (Zheng *et al.*, 2024). Melalui analisis kemampuan hidrofobisitas dan autoagregasi dengan mengeksplorasi ekspresi gen yang relevan, *L. plantarum* memiliki mekanisme pertahanan terhadap patogen serta terlibat dalam mengatur imunitas dan peradangan (Derosa *et al.*, 2018). Karakteristik ini penting karena mendukung viabilitas bakteri selama transit *gastrointestinal* dan meningkatkan peluang interaksinya dengan mukosa inangnya.

2.3.1. Resistensi terhadap pH

Resistensi terhadap pH merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan untuk mengevaluasi karakteristik isolat *L. plantarum* sebagai agen probiotik. Ketahanan bakteri *L. plantarum* terhadap asam lambung menjadi salah satu karakteristik yang penting bagi probiotik agar mampu memiliki sistem perlindungan pada kondisi pH rendah (Wu *et al.*, 2021). *Strain* bakteri yang dapat bertahan pada pH rendah menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi pada kondisi asam lambung, serta berpeluang untuk memberikan manfaat yang lebih baik untuk tubuh. Suatu bakteri dapat disebut sebagai agen probiotik ketika memiliki kemampuan untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel dalam berbagai kondisi khususnya pada pH rendah, tekanan mekanik, dan simulasi pencernaan secara *in vitro* (Jike *et al.*, 2024). Oleh karena itu, kemampuan *L.*

plantarum untuk bertahan pada kondisi pH rendah menjadi indikator penting dalam menentukan potensi dan efektivitasnya sebagai agen probiotik yang mampu memberikan manfaat kesehatan bagi inang.

2.3.2. Resistensi terhadap Garam Empedu (*Bile Salt*)

Pengujian resistensi terhadap garam empedu (*bile salt*) merupakan salah satu parameter penting dalam evaluasi *Lactiplantibacillus plantarum* sebagai kandidat probiotik. Setelah melewati lambung yang memiliki kondisi asam, bakteri harus mampu bertahan terhadap paparan garam empedu di usus halus yang dapat merusak membran sel, memicu stres oksidatif, dan mengganggu kestabilan fisiologis sel bakteri (Fidanza *et al.*, 2021). Kemampuan ini didukung oleh beberapa mekanisme adaptasi, terutama aktivitas enzim *bile salt hydrolase* (BSH), perubahan komposisi dan fluiditas membran, serta perlindungan terhadap kerusakan oksidatif sehingga bakteri dapat mempertahankan homeostasisnya pada lingkungan yang mengandung garam empedu. Secara fenotipik, 75% dari 44 strain *L. plantarum* masih mampu mentoleransi 0,3% garam empedu, yang mendekati rerata konsentrasi garam empedu pada saluran cerna manusia (Sun *et al.*, 2022). Selain itu, strain *L. plantarum* yang tahan terhadap garam empedu, umumnya juga dapat bertahan pada kondisi *gastrointestinal* dan kemampuan adhesi yang baik.

2.3.3. Kemampuan Autoagregasi dan Hidrofobisitas Permukaan Sel

Autoagregasi merupakan kemampuan bakteri dimana sel-sel bakteri dengan jenis yang sama saling menempel satu sama lain, membentuk gumpalan

multiseluler, dan berakhir mengendap di dasar tabung kultur. Sifat autoagregasi bakteri menjadi salah satu karakteristik utama probiotik, dimana bakteri yang sejenis akan beragregat (Riani *et al.*, 2020). Autoagregasi diuji dengan menginkubasi suspensi sel di saline dan mengukur penurunan absorbansi selama beberapa jam; nilai agregasi 40–80% menunjukkan kemampuan kohesi baik. Pengujian autoagregasi umumnya dilakukan untuk mengetahui kemampuan sel bakteri saling mengikat, yang berhubungan dengan kemampuan adhesi, pembentukan koloni, serta potensi penghambatan pelekatan patogen pada permukaan mukosa usus (Isenring *et al.*, 2021).

Hidrofobisitas permukaan sel juga menjadi salah satu karakteristik penting probiotik pada *Lactiplantibacillus plantarum* karena mencerminkan kecenderungan sel bakteri untuk berinteraksi dengan permukaan nonpolar, yang pada akhirnya berhubungan dengan kemampuan adhesi awal dan epitel saluran cerna. Hidrofobisitas permukaan sel berperan dalam interaksi nonspesifik antara bakteri dan permukaan mukosa usus melalui gaya hidrofobik dan elektrostatik (Qin *et al.*, 2022). Karakteristik ini memengaruhi tingkat adhesi bakteri pada lapisan mukus sehingga berkontribusi terhadap keberhasilan kolonisasi probiotik di saluran pencernaan. Kemampuan adhesi pada berbagai isolat *L. plantarum* bervariasi menurut habitat asalnya, dan isolat dengan daya lekat sangat tinggi juga menunjukkan hidrofobisitas permukaan sel yang tinggi, tetapi sifat ini akan melemah setelah perlakuan LiCl dan guanidine-HCl (Buntin *et al.* 2017).

2.3.4. Aktivitas Antimikroba

Aktivitas antimikroba menjadi salah satu karakteristik krusial dari *Lactiplantibacillus plantarum* sebagai agen probiotik, khususnya dalam menghambat proliferasi berbagai mikroorganisme merugikan di dalam sistem pencernaan maupun pada matriks pangan. Karakteristik ini didapatkan melalui produksi berbagai metabolit aktif seperti asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin spesifik yang bekerja secara sinergis untuk mengganggu homeostasis seluler bakteri target. Sekresi asam laktat dan asam asetat oleh *L. plantarum* secara efektif menurunkan pH lingkungan sehingga menciptakan kondisi sitotoksik patogen berbahaya seperti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Escherichia coli* (Rocchetti *et al.*, 2021). *Listeria monocytogenes* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen Gram positif yang sering dikaitkan dengan kejadian penyakit bawaan pangan (*foodborne disease*). Keduanya umum ditemukan pada lingkungan maupun bahan pangan, dimana *Listeria monocytogenes* dapat ditemukan di jenis makanan *ready-to-eat*, *seafood*, produk olahan susu yang menghasilkan enterotoksin tahan panas sehingga menyebabkan *foodborne disease* (Tjampakasari, 2021). *Staphylococcus Aureus* merupakan bakteri yang secara alami terdapat di kulit, rongga hidung, dan saluran pencernaan manusia, yang dapat bertumbuh juga pada pangan pada suhu ruang, dan dapat menghasilkan toksin sehingga menyebabkan *toxic shock syndrome* pada manusia (Nurmila dan Kusdiyantini, 2018).

Bakteri patogen lainnya yang diuji yaitu *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen Gram negatif yang kerap kali

ditemukan ketikan mengonsumsi pangan. *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri yang sering mengontaminasi produk pangan seperti daging unggas, telur, susu mentah, dan sayuran sehingga menjadi salah satu penyebab utama penyakit seperti diare dan demam tifoid yang dapat mengancam kesehatan masyarakat di seluruh penjuru dunia (Armah *et al.*, 2021). *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang berpotensi mengontaminasi makanan dan dapat disebarkan melalui media air yang sering digunakan untuk berbagai proses pengolahan makanan (Yulistiani *et al.*, 2023). Kedua bakteri patogen Gram negatif ini tentunya memiliki efek yang berbahaya bagi tubuh manusia sehingga kerap kali digunakan sebagai bakteri indikator dalam pengujian aktivitas antimikroba untuk mewakili bakteri Gram negatif yang memiliki membran luar lipopolisakarida, sehingga relatif lebih tahan terhadap berbagai senyawa antimikroba dibandingkan bakteri Gram positif. Kemampuan *L. plantarum* dalam menghasilkan senyawa antimikroba seperti *plantaricin* memberikan keunggulan kompetitif karena mampu merusak integritas membran sitoplasma dan menghambat sintesis dinding sel bakteri lawan, yang pada gilirannya memberikan perlindungan bioterapi serta memperpanjang masa simpan produk melalui biopreservasi (Ginneken *et al.*, 2026). Sifat multifungsi ini menjadikan *L. plantarum* sebagai kandidat probiotik yang sangat potensial untuk mengeliminasi kolonisasi patogen sekaligus mendukung keseimbangan mikrobiota inang secara berkelanjutan.

2.4. Keamanan *Lactiplantibacillus plantarum* untuk Konsumsi Manusia

Lactiplantibacillus plantarum merupakan salah satu bakteri asam laktat yang banyak digunakan dalam pangan fermentasi dan kandidat probiotik, sehingga aspek keamanannya menjadi prasyarat utama sebelum diaplikasikan untuk konsumsi manusia. Keamanan spesies ini juga didukung oleh pendekatan *Qualified Presumption of Safety* (QPS) dari *European Food Safety Authority* (EFSA), yaitu sistem pra-evaluasi keamanan mikroorganisme yang mempertimbangkan identitas taksonomi, pengetahuan ilmiah yang tersedia, dan potensi risiko pada tingkat strain (EFSA, 2026). Selain itu, tinjauan sistematis dan meta-analisis oleh Aljohani *et al.* (2024) menunjukkan bahwa konsumsi probiotik *L. plantarum* pada studi manusia umumnya dapat ditoleransi, meskipun keamanan tetap perlu dievaluasi secara spesifik berdasarkan strain, terutama terkait keberadaan gen virulensi dan resistensi antibiotik yang dapat ditransfer.

Pengujian sensitivitas terhadap antibiotik pada isolat *Lactiplantibacillus plantarum* menjadi salah satu pengujian untuk karakteristik probiotik karena probiotik dikonsumsi dalam keadaan hidup dan dapat berinteraksi dengan mikrobiota saluran pencernaan manusia. Penilaian probiotik tidak cukup hanya berdasarkan kemampuan bertahan pada asam lambung, garam empedu, atau aktivitas antimikroba, tetapi juga harus mencakup aspek keamanan, termasuk kemungkinan adanya resistensi antibiotik yang bersifat didapat dan berpotensi ditransfer ke mikroorganisme lain. Uji sensitivitas antibiotik ditempatkan sebagai bagian dari *safety assessment* bersama uji hemolisis untuk memastikan bahwa isolat

yang dikembangkan tidak membawa sifat yang dapat menimbulkan risiko bagi konsumen (Nath *et al.*, 2020). Bakteri asam laktat kandidat probiotik memerlukan pengujian resistensi antibiotik pada bakteri asal pangan atau manusia untuk mengetahui sifat keamanan yang berkaitan dengan gen resistensi yang mudah berpindah melalui elemen genetik bergerak (Duche *et al.*, 2023). Dengan demikian, uji sensitivitas antibiotik penting dilakukan untuk membedakan resistensi intrinsik yang umum pada bakteri asam laktat dari resistensi yang diperoleh, sekaligus memperkuat kelayakan isolat *L. plantarum* sebagai kandidat probiotik yang aman untuk konsumsi manusia.

2.5. Fitur Fungsional *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum merupakan salah satu bakteri asam laktat yang banyak dimanfaatkan sebagai probiotik karena memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap berbagai lingkungan, termasuk bahan pangan fermentasi dan saluran pencernaan manusia. Bakteri ini dikenal memiliki sejumlah fitur fungsional yang mendukung perannya sebagai probiotik, seperti kemampuan berinteraksi dengan permukaan mukosa usus, menghasilkan senyawa antimikroba, serta berkontribusi dalam menjaga keseimbangan mikrobiota intestinal (Garcia-Gonzales *et al.*, 2021). Selain itu, pemanfaatan *L. plantarum* sebagai probiotik memberikan potensi yang mendukung kesehatan inang melalui berbagai mekanisme biologis spesifik pada masing-masing strain, sehingga karakterisasi isolat menjadi penting sebelum diaplikasikan lebih lanjut (Fidanza *et al.*, 2021).

Salah satu fitur fungsional yang perlu dimiliki oleh *L. plantarum* adalah aktivitas antioksidan, yaitu kemampuan bakteri dalam membantu mengurangi stres

oksidatif melalui penetralan radikal bebas, peningkatan sistem pertahanan antioksidan, dan keseimbangan redoks sel. Berbagai strain *L. plantarum* yang diisolasi dari pangan fermentasi tradisional menunjukkan kapasitas antioksidan yang tinggi, sehingga menunjukkan potensi besar untuk dikembangkan sebagai probiotik fungsional (Sun *et al.* 2022). Strain *L. plantarum* umumnya harus mampu bertahan terhadap paparan hidrogen peroksida, memiliki aktivitas penangkap radikal bebas, serta memperlihatkan aktivitas enzim antioksidan (Wu *et al.*, 2023). Aktivitas antioksidan menjadi salah satu karakteristik fungsional *L. plantarum* yang berkontribusi terhadap potensi manfaatnya bagi kesehatan.

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Desember 2025. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan dan Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah. Materi yang digunakan dan metode penelitian yang dikerjakan, diuraikan sebagai berikut.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini meliputi isolat BAL yang berasal dari buah matoa segar. Pengujian potensi probiotik dan aktivitas fungsional digunakan pula empat strain bakteri patogen referensi, yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 dan *Escherichia coli* ATCC 25522 yang didapatkan dari Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro, serta *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 dan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 yang didapatkan dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada sebagai mikroorganisme target dalam uji antimikroba. Media yang digunakan dalam penelitian ini meliputi MRS agar, Nutrien Agar, MRS broth, larutan NaCl, HCl, NaOH, garam empedu (*bile salt*), xylene, dan standar McFarland 0,5. Peralatan yang digunakan mencakup *centrifuge tube*, sentrifugasi, inkubator, pH meter ohaus, spektrofotometer, mikropipet, cawan petri *disposable*, kuvet plastik, jarum ose, pinset, *cotton swab*, sarung tangan *latex*, alkohol 70%, *chlorine*, bunsen, korek api, kertas label, *cling wrap*, *aluminium foil*, spidol,

pulpen, labu erlenmeyer, gelas ukur, sendok, pipet tetes, timbangan analitik, plastik tahan panas, gelas beaker, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *laminar air flow*, *colony counter*, autoklaf.

3.2. Metode Penelitian

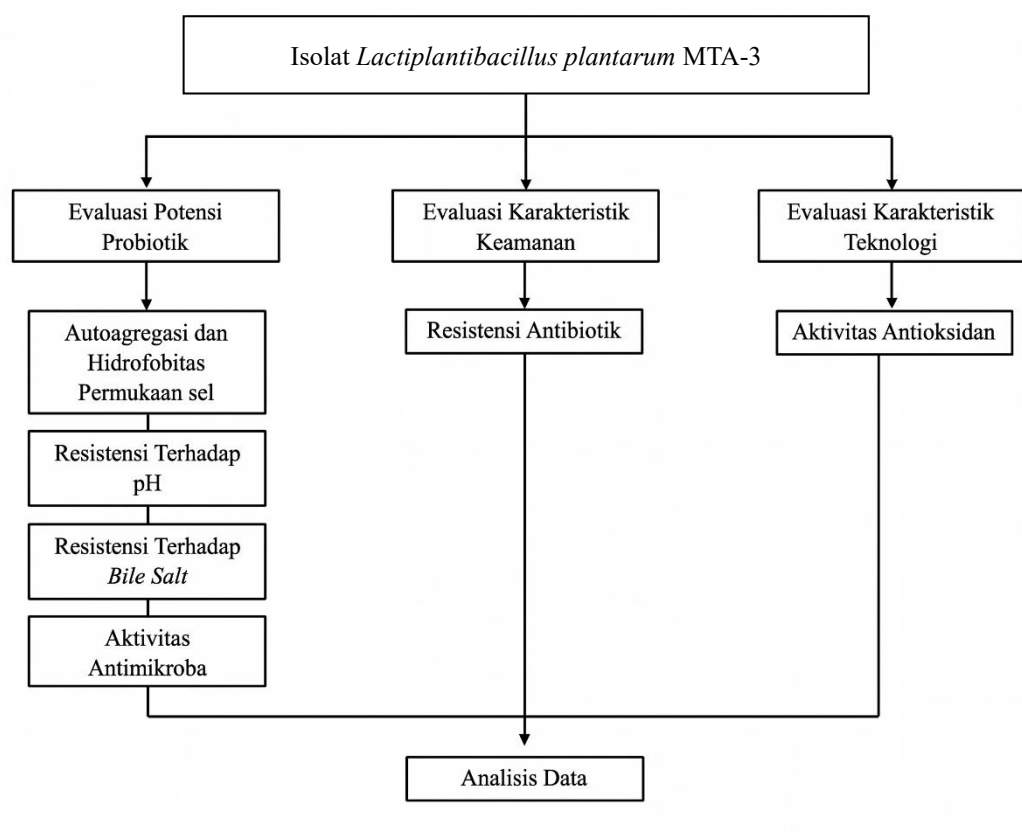
Metode penelitian mencakup rancangan penelitian, prosedur penelitian, serta analisis data yang didapatkan dari hasil penelitian. Penelitian ini dilakukan dengan metode penelitian eksploratif-deskriptif.

3.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode penelitian eksploratif-deskriptif. Metode penelitian eksploratif merupakan penelitian yang mengumpulkan data fakta yang tersedia di lapangan melalui pencatatan dan pengamatan secara terperinci, kemudian dilakukan analisis data berdasarkan data kualitatif dan kuantitatif (Papatungan *et al.*, 2015).

3.2.2. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi pengujian parameter meliputi resistensi terhadap pH, resistensi terhadap *bile salt*, autoagregasi dan hidrofobisitas permukaan sel, aktivitas antimikroba, aktivitas antioksidan, sensitivitas terhadap antibiotik, dan analisis data yang dapat dijabarkan dalam Ilustrasi 1 di bawah ini.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian

3.2.3. Inokulasi Isolat *Lactiplantibacillus plantarum* MTA-3

Inokulasi isolat *L. plantarum* MTA-3 mengacu pada penelitian Moghimani *et al.*, (2024). Isolat *L. plantarum* MTA-3 diambil sebanyak 1 ml menggunakan micropipet dan dimasukkan ke dalam MRS *broth* steril, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, isolat siap digunakan untuk dilakukan pengujian evaluasi potensi probiotik, evaluasi keamanan dengan uji sensitivitas terhadap antibiotik, serta evaluasi aktivitas antioksidan.

3.2.4. Evaluasi Potensi Probiotik

a. Resistensi terhadap pH

Pengujian resistensi terhadap pH mengacu kepada penelitian Moghimani *et al.* (2024). Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasi strain bakteri dalam MRS *broth* yang diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Selanjutnya, 1 mL sel bakteri disuspensikan kembali dalam larutan NaCl yang telah disesuaikan pH-nya seperti pH 2,5 (simulasi kandungan lambung), pH 7 (kontrol), dan pH 8 (simulasi kandungan usus halus). Pengujian awal pada H0 dilakukan melalui pengenceran yang dimulai dari 10^{-1} hingga 10^{-8} menggunakan NaCl 0,85% untuk setiap pH. Larutan ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam, dan dilakukan pengenceran kembali dengan pengurangan satu tingkatan pengenceran menjadi 10^{-7} . Seluruh sampel yang telah diencerkan kemudian diambil pada setiap tiga pengenceran terakhir, yaitu 10^{-6} hingga 10^{-8} untuk H0 dan 10^{-5} hingga 10^{-7}

untuk H3. Sebanyak 1 mL sampel kemudian diletakkan di dalam cawan petri dan diberikan MRS agar steril yang dihomogenkan melalui metode *pour plate*. Uji viabilitas dilakukan melalui perhitungan jumlah koloni yang terbentuk pada MRS agar yang telah didiamkan selama 48 jam pada suhu 37°C dalam kondisi anaerob. *Survival rate* setiap pH kemudian dihitug menggunakan rumus:

$$SR (\%) = \frac{H3}{H0} \times 100$$

Keterangan :

H3 : Jam ke 3

H0 : Jam ke 0

b. Resistensi terhadap *Bile Salt*

Pengujian resistensi terhadap *bile salt* mengacu kepada penelitian Moghimani *et al.* (2024). Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasi *strain L. plantarum* MTA-3 dalam MRS broth dengan tambahan 0,3% *bile salt*. Pengamatan H0 dilakukan melalui pengenceran berseri dari 10⁻¹ hingga 10⁻⁷ menggunakan larutan NaCl steril 0,85%. Selanjutnya, sampel diambil sebanyak 1 mL dari 3 pengenceran terakhir dan diletakkan ke dalam cawan petri *disposable*, kemudian ditambahkan media MRS Agar steril, dan dihomogenkan dengan membentuk angka delapan pada metode *pour plate* sehingga bakteri tersebar merata. Larutan isolat *L. plantarum* MTA-3 kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Setelah diinkubasi, sampel kemudian diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran ulang dengan pengurangan jumlah pengenceran satu tingkatan. Tiga pengenceran terakhir yaitu 10⁻⁴ hingga 10⁻⁶ diambil sebanyak 1 mL untuk ditambahkan media

MRS Agar steril seperti yang dilakukan pada H0. Uji viabilitas dilakukan melalui pencacahan koloni pada MRS Agar yang dimodifikasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam kondisi anaerob. *Survival rate* isolat *L. plantarum* MTA-3 kemudian dihitung menggunakan rumus:

$$SR (\%) = \frac{H4}{H0} \times 100$$

Keterangan :

H4 : Jam ke 4

H0 : Jam ke 0

c. Autoagregasi dan Hidrofobisitas Permukaan Sel

Pengujian autoagregasi mengacu kepada penelitian Moghimani *et al.* (2024). Pengujian dilakukan dengan cara menginokulasi strain bakteri dalam MRS broth yang diinkubasi selama semalam dengan suhu 37°C, kemudian disentrifugasi (5000×g selama 15 menit pada 4°C), dan pelet bakteri dicuci tiga kali dengan larutan NaCl steril, sampel kemudian di vortex selama 10 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Untuk mendapatkan persentase autoagregasi, absorbansi isolat diukur dengan spektrofotometer pada 600 nm di jam ke 0, 6, dan 24, kemudian persentase autoagregasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Autoagregasi (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100$$

Keterangan :

A₀ : Absorbansi H0.

A₁ : Absorbansi H6, H12, dan H24

Pengujian Hidrofobisitas permukaan sel mengacu kepada penelitian penelitian Moghimani *et al.* (2024). Pengujian dilakukan dengan cara

menginokulasi strain bakteri dalam MRS broth yang diinkubasi selama semalam dengan suhu 37°C, kemudian disentrifugasi (5000×g selama 15 menit pada 4°C), kemudian pelet bakteri dicuci tiga kali dengan larutan NaCl steril dan dicampurkan dengan xylene dalam rasio 3:1 (v/v) dan divortex selama 2 menit. Setelah satu jam pada suhu 37°C, absorbansi diukur pada 600 nm. Hidrofobisitas dihitung dengan rumus :

$$\text{Hidrofobisitas (\%)} = 1 - \left(\frac{A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Keterangan :

A₀ : nilai absorbansi awal pada 600 nm.

A₁ : nilai absorbansi akhir pada 600 nm.

d. Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba mengacu kepada penelitian penelitian Moghimani *et al.* (2024). Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan empat strain patogen manusia, yaitu *S. aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25522, *L. monocytogenes* ATCC 7644, dan *S. typhimurium* ATCC 14028. Keempat patogen ini digunakan sebagai bakteri target dan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik yang umum digunakan secara klinis melalui metode difusi cakram (sesuai dengan prosedur pada uji sensitivitas antibiotik). Empat patogen tersebut ditumbuhkan dalam 9 ml nutrient broth yang diinkubasi pada suhu 37oC selama 24 jam, kemudian disentrifugasi (5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C) untuk memisahkan cairan nutrient broth dan pelet bakteri patogen. Cairan nutrient broth dibuang dan pelet patogen yang tersisa dicuci 2 kali dengan NaCl 0,85% steril,

kemudian suspensikan dengan NaCl 0,85% steril dan samakan kekeruhan dengan standar McFarland 0,5. Standar McFarland 0,5 menjadi referensi kekeruhan untuk memperkirakan konsentrasi sel bakteri yang setara dengan kepadatan suspensi bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Suspensi patogen tersebut dilakukan swab pada Nutrient Agar menggunakan cotton swab dan letakkan dengan jarak blank disk yang sudah terendam cairan MRS broth dari hasil inkubasi isolat *L. plantarum* NGK-2 selama 10 menit dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 48 jam, zona bening disekitar cakram pertumbuhan diukur.

3.2.5. Evaluasi Keamanan dengan Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik

Pengujian sensitivitas terhadap antibiotik mengacu kepada penelitian Moghimani *et al.* (2024). Uji resistensi antibiotik terhadap isolat dilakukan menggunakan metode difusi cakram (*disk diffusion method*). Pengujian dimulai dengan kultur semalaman masing-masing isolat diinokulasikan secara merata pada media agar MRS dan PDA. Cakram antibiotik yang digunakan meliputi penisilin, ampicilin (10 mg per cakram), eritromisin (15 mg per cakram), vankomisin, kloramfenikol, dan tetrasiklin (30 mg per cakram), serta cakram kertas saring sebagai kontrol. Seluruh cakram diletakkan di atas permukaan agar dengan jarak yang cukup agar zona hambat tidak saling tumpang tindih. Selanjutnya, cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat di sekitar masing-masing cakram (nilai ZDI) diukur dan diinterpretasikan berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tahun 2009. Hasil pengujian

kemudian diklasifikasikan ke dalam tiga kategori, yaitu resisten ($ZDI \leq 15$ mm), intermediate ($ZDI 16-20$ mm) , dan sensitif ($ZDI \geq 21$ mm).

3.2.6. Evaluasi Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan mengacu kepada penelitian Moghimani *et al.* (2024), isolat diukur menggunakan uji DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Pada pengujian ini, volume yang sama dari CFS (*cell-free supernatant*) masing-masing isolat dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH dalam etanol dengan konsentrasi 0,2 mmol. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam kondisi gelap selama 1 jam. Setelah inkubasi, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 517 nm. Kontrol pada pengujian ini berupa campuran 1 mL larutan DPPH dan 1,5 mL methanol. Aktivitas antioksidan, yang dinyatakan sebagai persentase *scavenging activity* dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas antioksidan(\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A_{kontrol} : Nilai absorbansi larutan DPPH tanpa sampel (kontrol)

A_{sampel} : Nilai absorbansi sampel dengan penambahan DPPH

3.2.4. Analisis Data

Analisis data hasil percobaan dilakukan dengan menggunakan Microsoft Excel 2019 dan disajikan dalam bentuk rata-rata dan standar deviasi. Hasil data kemudian disajikan secara deskriptif.