

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Udang putih dikenal dengan nama ilmiah *Penaeus merguensis*, yang ditemukan di Indonesia, termasuk di Perairan Papua Barat Daya. Populasi udang putih ini memiliki keberlimpahan yang tinggi, dan menjadi salah satu sumberdaya perikanan penting bagi masyarakat di Kabupaten Sorong Selatan. Produksi perikanan tangkap laut komoditas udang pada tahun 2024 di Sorong Selatan tercatat 214.122 ton (KKP, 2026) yang terdiri dari udang barong (lobster), udang windu, udang jerbung (*Penaeus merguensis*), dan udang dogol (*Metapenaeus monoceros*) dan udang rebon (BPS Sorong, 2025), dan khusus untuk udang putih pada tahun 2024 tercatat 82.693 ton (DKP Sorong selatan, 2025). Di pasar internasional, udang putih dikenal dengan berbagai nama dagang, seperti *white prawn*, *banana prawn* atau *white shrimp*. Kehadiran udang di Perairan Sorong Selatan didukung oleh ekosistem hutan bakau yang luas, sehingga memberikan lingkungan yang baik bagi berbagai organisme laut (Sala et al., 2021). Udang putih merupakan sumberdaya perikanan ekonomis penting, terutama dalam konteks lokal di mana sering dihidangkan di restoran seafood dengan harga yang cukup tinggi, sementara udang rebon umumnya diolah menjadi terasi. Terasi merupakan salah-satu bumbu penambah cita rasa pada berbagai makanan khas Indonesia seperti sambal, rujak, dan sebagainya.

Pemilihan terasi udang rebon sebagai sumber isolat bakteri penghasil bakteriosin didasarkan pada karakteristik proses fermentasinya yang berlangsung secara alami dan melibatkan komunitas mikroba yang telah beradaptasi terhadap kondisi lingkungan ekstrem, seperti kadar garam tinggi dan ketersediaan nutrisi terbatas. Kondisi tersebut mendorong seleksi bakteri yang mampu bertahan melalui mekanisme kompetisi antarmikroba, salah satunya dengan memproduksi senyawa antimikroba seperti bakteriosin. Selain itu, terasi udang rebon merupakan produk fermentasi tradisional berbasis sumberdaya lokal yang telah lama dikonsumsi masyarakat, sehingga bakteri yang terkandung di dalamnya memiliki potensi lebih besar untuk menghasilkan bakteriosin yang aman dan kompatibel untuk aplikasi pangan, khususnya sebagai pengawet alami pada produk perikanan.

Terasi udang dibuat dengan memanfaatkan bakteri asam laktat sehingga terasi merupakan sumber bakteri asam laktat yang potensial. Bakteri asam laktat tumbuh secara spontan selama proses fermentasi pada proses pengolahan terasi, karena media fermentasi yang terdiri dari garam, gula dan udang rebon mendukung pertumbuhan bakteri tersebut. Bakteri asam laktat menghasilkan metabolit sekunder salah-satunya adalah bakteriosin. Bakteriosin adalah peptida kompleks yang bersifat aktif yang disintesis di dalam ribosom. Bakteriosin memiliki sifat bakterisidal (membunuh bakteri) atau bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri) (Zacharof dan Lovitt, 2012). Berdasarkan sifat antimikroba yang dimiliki, bakteriosin dapat dijadikan sebagai bahan pengawet pada produk pangan.

Salah satu tantangan yang dihadapi hasil perikanan, termasuk udang putih, adalah mudahnya komoditas ini mengalami pembusukan. Udang mulai mengalami proses pembusukan tidak lama setelah ditangkap. Proses ini dipicu oleh aktivitas enzim yang terdapat secara alami di dalam tubuh udang itu sendiri, yang selanjutnya akan dipercepat oleh aktivitas mikroorganisme setelah substrat hasil penguraian enzimatik tersedia untuk pertumbuhan mikroorganisme. Daging udang memiliki tekstur yang lembut sehingga mudah terurai oleh proses autolisis (Berty, 2020). Mikroorganisme dapat menyebabkan berbagai perubahan baik secara biokimia maupun fisik yang mengakibatkan sifat-sifat yang tidak diinginkan, bahkan kerusakan total dari bahan pangan. Dampak dari kemunduran mutu udang menunjukkan adanya perubahan warna misalnya keabu-abuan atau kemerahan yang abnormal, menimbulkan bau menyengat yang tidak sedap, terdapat lendir berlebih pada permukaan tubuh, dan tekstur menjadi lembek dan tidak elastis (Ahmad et al., 2025).

Pemilihan udang putih sebagai objek aplikasi pengawet dalam penelitian ini didasarkan pada karakteristik biologis dan ekonomisnya yang menjadikannya sangat rentan terhadap kemunduran mutu pascapanen. Udang putih memiliki kandungan air dan protein yang tinggi serta tekstur daging yang lembut, sehingga menyediakan substrat yang sangat ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme pembusuk dan patogen (Aarslev et al., 2025). Selain itu, udang putih umumnya dipasarkan dalam kondisi segar dan sering mengalami penanganan serta distribusi yang panjang sebelum sampai ke konsumen, sehingga risiko penurunan mutu mikrobiologis menjadi sangat tinggi. Kondisi ini menjadikan udang putih sebagai komoditas yang tepat untuk mengevaluasi efektivitas suatu pengawet alami dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan memperpanjang umur simpan produk.

Proses pembusukan pada bahan pangan dapat dicegah atau dihambat dengan menggunakan bahan pengawet. Namun sejauh ini masyarakat masih banyak menggunakan pengawet sintetik, termasuk pengawet sintetik non-pangan. Pengawet sintetik non-pangan yang sering disalahgunakan oleh masyarakat, diantaranya boraks, asam salisilat, aspirin, kalium bromate, dulsin, kloramfenikol, kalium klorat dan formaldehid (Zao et al., 2021). Pengawet sintetik merupakan bahan kimia buatan yang ditambahkan ke makanan, kosmetik, obat-obatan, dan produk-produk lainnya (Kumari et al., 2019). Namun, senyawa-senyawa ini dapat menyebabkan karsinogenik, iritasi kulit dan mata, serta risiko kanker jika terpapar dalam jumlah besar dan dalam jangka waktu lama. Alasan para pengguna bahan pengawet sintetik tersebut, adalah karena mudah didapatkan dan murah (Hermawan et al., 2020). Pengawet memiliki fungsi di antara lain membantu menjaga kualitas dan kesegaran produk, mencegah pertumbuhan bakteri, jamur, dan mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan atau kerusakan (Teshome et al., 2022). Pengawet sintetik dapat membantu mengurangi risiko ini dengan menghambat pertumbuhan mikroorganisme berbahaya, namun juga menimbulkan risiko yang merugikan kesehatan konsumen (Kumar et al., 2023).

Pengawet yang sering digunakan pada udang dan produk makanan laut adalah natrium metabisulfit (*sodium metabisulfite*) dan sulfur dioksida (SO₂). Natrium metabisulfit berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba, yang membantu

mempertahankan kualitas dan kesegaran udang selama penyimpanan dan distribusi (Lalitha priya et al., 2019). Jenis pengawet ini dapat digunakan dalam berbagai bentuk, termasuk sebagai larutan yang diberikan pada udang atau sebagai bagian dari campuran es untuk membantu mencegah kerusakan selama pembekuan. Namun, sejumlah orang menunjukkan reaksi alergi terhadap bahan pengawet tersebut. Efek merugikan yang dapat timbul jika natrium metabisulfite dan sulfur dioksida dikonsumsi dalam jumlah berlebihan adalah ruam kulit, gatal-gatal, sesak nafas, bersin-bersin, hidung tersumbat, atau bahkan reaksi alergi yang lebih parah seperti anafilaksis (Andrade et al., 2015; Pulungan, 2020). Nitrit dan nitrat juga seringkali digunakan sebagai pengawet namun jika penggunaan secara terus-menerus dapat menyebabkan risiko kanker dan gangguan lainnya (Zhang et al., 2023).

Meningkatnya kesadaran masyarakat akan bahaya yang ditimbulkan oleh penggunaan bahan pengawet sintetis mendorong berbagai upaya untuk mencari sumber-sumber alternatif pengawet yang tidak menimbulkan risiko terhadap kesehatan dan bersifat ramah lingkungan. Hal ini diyakini dapat dicapai dengan menggunakan jenis pengawet alami yang berasal dari makhluk hidup, baik dari tumbuhan, hewan, maupun mikroorganisme. Untuk mikroorganisme, jenis yang potensial dalam menghasilkan senyawa pengawet alami adalah bakteri yang diisolasi dari makanan hasil fermentasi. Salah-satu jenis bakteri dari makanan hasil fermentasi adalah bakteri asam laktat. Bakteri ini mampu menghasilkan bakteriosin yang dapat digunakan sebagai *bio-preservative* (Galvez et al., 2007; Forsythe dan Bienenstock, 2010).

Bakteriosin adalah senyawa protein yang diproduksi oleh bakteri asam laktat untuk melindungi diri mereka dari bakteri lain dalam lingkungan yang sama. Bakteriosin memiliki aktivitas antimikroba yang cukup kuat terhadap bakteri pembusuk dan patogen yang sering ditemukan pada makanan, seperti *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Listeria monocytogenes* (Abdulsain et al., 2020). Bakteriosin telah terbukti efektif sebagai antimikroba terhadap berbagai jenis bakteri industri yang menyebabkan penyakit pada manusia, termasuk *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus*. Bakteriosin bekerja dengan cara menembus sel bakteri dan merusak struktur sel yang mengarah pada kematian bakteri (Sindi et al., 2020).

Bakteriosin mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen ataupun bakteri pembusuk (Kirtonia et al., 2021), sehingga dapat digunakan sebagai *bio-preservative* (Bharti et al., 2015; Angelopoulou et al., 2020). Bakteriosin diidentifikasi sebagai pengawet alami yang aman untuk digunakan dalam makanan (Pal et al., 2015). Selain keamanannya, keunggulan lain dari penggunaan bakteriosin sebagai pengawet adalah keberlanjutannya. Bakteriosin diproduksi secara alami oleh bakteri dan dapat ditemukan dalam lingkungan alami, sehingga tidak memerlukan pengolahan kimia atau sintetis. Hal ini membuat bakteriosin menjadi pengawet alami yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan. Beberapa tahun terakhir, penggunaan bakteriosin sebagai pengawet alami telah meningkat, terutama

pada makanan. Bakteriosin telah terbukti efektif dalam mencegah pertumbuhan bakteri dan memperpanjang umur simpan makanan (O'Connor et al., 2020).

Bakteriosin juga memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan bahan pengawet lainnya, seperti kestabilan terhadap panas dan asam, sehingga dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim. Bakteriosin juga tidak mudah dihancurkan oleh enzim proteolitik, membuatnya lebih tahan lama dalam lingkungan yang mengandung enzim proteolitik (Peng et al., 2023). Bakteriosin telah diaplikasikan pada beberapa produk diantaranya pada daging segar (Nurraifah, et al., 2021) dan udang segar (Rahayu et al., 2004). Rahayu et al. (2004) menemukan adanya penurunan bakteri satu *log cycle* (90%) dari jumlah populasi awal.

Keefektifan sebagai antimikroba serta keunggulannya dalam kestabilan dan ketahanan terhadap lingkungan yang ekstrim menjadikan bakteriosin sebagai alternatif yang menarik sebagai bahan pengawet makanan yang potensial (Wang et al., 2025). Oleh karena itu, penelitian mengenai isolasi dan identifikasi bakteri penghasil bakteriosin dari terasi udang, karakterisasi bakteriosin dan performanya sebagai pengawet pada udang putih penting dilakukan untuk mengevaluasi efektivitas penggunaannya sebagai pengawet alami. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi penting bagi industri makanan dalam mengembangkan produk makanan yang lebih aman dan bertahan lebih lama.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka penting untuk diteliti mengenai isolasi dan identifikasi bakteri dari terasi udang rebon, profil bakteriosin dan efektivitasnya pada udang putih sebagai pengawet alami. Sehingga, rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apa golongan bakteri potensial penghasil bakteriosin yang terdapat pada terasi udang rebon?
2. Bagaimana profil bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri yang berasal dari terasi udang rebon?
3. Bagaimana efektivitas bakteriosin sebagai pengawet alami pada udang putih segar?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijelaskan, tujuan dalam rencana penelitian adalah:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi golongan bakteri penghasil bakteriosin yang diisolasi dari terasi udang rebon.
2. Menganalisis profil bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri penghasil bakteriosin yang diisolasi dari terasi udang rebon.
3. Menganalisis efektivitas bakteriosin sebagai pengawet alami pada udang putih segar.

1.4 Hipotesis Penelitian

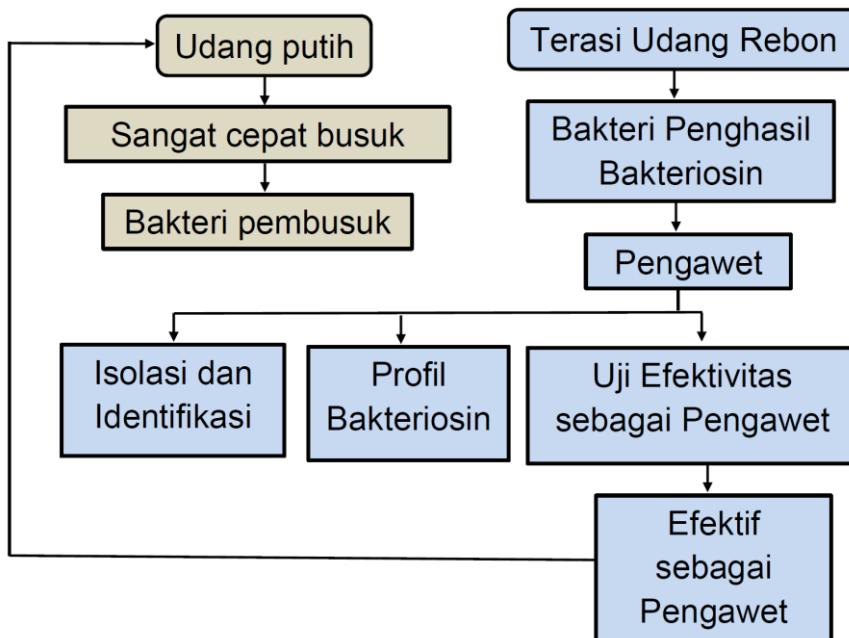
Hipotesis dalam rencana penelitian ini ialah:

1. Terasi udang rebon mengandung bakteri penghasil bakteriosin yang termasuk ke dalam golongan bakteri asam laktat.
2. Bakteriosin terdiri dari protein dengan berat molekul rendah dan tersusun dari 20 jenis asam amino
3. Bakteriosin efektif sebagai pengawet alami pada udang putih segar.

1.5 Kebaruan Penelitian

Jenis bakteri yang menghasilkan bakteriosin diantaranya *Lactobacillus plantarum* SLG10 yang diisolasi dari kombucha (Pei et al., 2020), *Latilactobacillus curvatus* LAB-3H dari yogurt tradisional (Heidari et al., 2022), *Lactobacillus* dari keju (Trejo et al., 2022), *Bacillus amyloliquefaciens* dari ikan laut *Epinephelus areolatus* (An et al., 2015), *Lactobacillus alimentarius* FM-MM 4 dari daging fermentasi *nanx wudi* (Hu et al., 2017), *Lactobacillus plantarum* JY22 dari usus ikan emas (Lv et al., 2018), *Lactobacillus fermentum* BZ532 dari minuman sereal fermentasi (Rasheed et al., 2020), *Lactobacillus plantarum* LPL-1 dari ikan fermentasi (Wang et al., 2018), dan *Lactobacillus plantarum* JLA-9 yang diisolasi dari kubis fermentasi (Xiang et al., 2021). Berdasarkan studi literatur maka kebaruan dari rencana penelitian ini ialah, belum ada hasil penelitian mengenai golongan bakteri penghasil bakteriosin dari terasi udang rebon yang berasal dari Sorong-selatan Papua Barat Daya.

1.6 Kerangka Pikir



BAB II

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TERASI UDANG REBON DAN UJI KONSENTRASI HAMBAT MINIMUM BAKTERIOSIN

2.1 Abstrak

SUKMAWATI. **Identifikasi molekuler bakteri asam laktat dari terasi udang rebon dan uji konsentrasi hambat minimum bakteriosin** (dibimbing oleh Metusalach, dan Syahrul).

Latar belakang. Bakteri memiliki peran penting dalam berbagai ekosistem, tidak hanya sebagai komponen utama dalam siklus biogeokimia, tetapi juga sebagai salah-satu sumber bioaktif. Bakteriosin, sebagai salah satu metabolit sekunder. Bakteriosin merupakan senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, senyawa ini memiliki sifat yang spesifik, stabil, dan ramah lingkungan. Bakteriosin memiliki potensi besar dalam pemanfaatannya di berbagai bidang, mulai dari pengawetan pangan hingga penggunaannya dalam bidang medis sebagai alternatif antibiotik. **Tujuan Penelitian.** Penelitian ini ialah untuk mengidentifikasi bakteri penghasil bakteriosin yang berasal dari terasi udang rebon dan mengevaluasi konsentrasi hambat minimum (KHM) bakteriosin kasar yang dihasilkan, untuk menilai kemampuan antimikrobanya. **Metode.** Penelitian ini merupakan metode eksplorasi yakni mengisolasi, mengidentifikasi spesies bakteri penghasil bakteriosin kasar dari terasi udang rebon berbasis gen 16S rRNA dan uji KHM bakteriosin dalam menghambat bakteri pembusuk pada udang. **Hasil.** Penghasil bakteriosin yang berasal dari terasi udang rebon dengan kode sampel TRS1 diidentifikasi sebagai *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, sampel TRS2 teridentifikasi sebagai *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 TRS2, dan sampel TRS3 termasuk spesies *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 TRS3. Ketiga sampel bakteri tersebut mampu menghasilkan bakteriosin dan mampu menghambat bakteri pembusuk pada udang di konsentrasi 0,19% dan 0,78%. **Kesimpulan.** Bakteri asam laktat yang teridentifikasi adalah *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732, dan *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098. Konsentrasi bakteriosin TRS1 memiliki nilai hambat 2,3 mm pada konsentrasi 0,19%, sampel TRS3 memiliki nilai hambat 2,3 mm pada konsentrasi 0,39%, dan sampel TRS2 memiliki nilai hambat 1,2 mm pada konsentrasi 0,78%.

Kata Kunci: antimikroba; pengawet; metabolit sekunder; bakteriosin; daya hambat

2.2 Pendahuluan

Bakteri tersebar luas dan sangat penting bagi ekosistem di bumi, berperan besar dalam siklus biogeokimia serta menjadi salah-satu sumber senyawa bioaktif (Wess, 2023). Kemampuan mereka dalam menghasilkan berbagai metabolit primer dan sekunder telah menarik minat penelitian yang signifikan. Metabolit-metabolit yang dihasilkan khususnya bakteriosin, berperan penting dalam interaksi ekologi bakteri (Gonzalez dan Aranda 2023). Bakteriosin merupakan metabolit sekunder

antimikroba yang digunakan oleh bakteri untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme pesaing. Senyawa ini memiliki prospek besar untuk berbagai aplikasi, termasuk sebagai alternatif alami pengganti pengawet kimia dalam pangan dan sebagai kandidat pengganti antibiotik dalam mengatasi resistensi antimikroba (Gonzalez dan Aranda 2023). Salah-satu kelompok bakteri penghasil bakteriosin adalah bakteri asam laktat (BAL).

Bakteriosin dari BAL merupakan pengawet alami yang efektif, mampu menghambat bakteri Gram positif dan, dalam formulasi terbaru, juga efektif pada bakteri Gram negatif (Lahiri et al., 2022). BAL dapat ditemukan pada produk fermentasi, seperti dalam fermentasi terasi udang. BAL, khamir, dan bakteri halofilik berperan dalam pembentukan cita rasa, namun dapat menyebabkan kerusakan (spoilage) apabila tidak terkontrol dengan baik (Li et al., 2021). Seiring meningkatnya kekhawatiran terhadap penggunaan pengawet sintetis. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri dari proses fermentasi terkontrol berpotensi menjadi alternatif alami sebagai pengganti pengawet sintetis, khususnya bila diaplikasikan bersama teknologi kemasan yang baik dalam upaya meningkatkan keamanan pangan (Karnwal et al., 2024).

Perkembangan penelitian mikroba memberikan dasar ilmiah yang kuat bahwa bakteriosin bisa dimanfaatkan secara lebih luas dalam pangan dan kesehatan. Contohnya bakteriosin nisin dan pediocin yang telah digunakan sebagai pengawet alami (Khan et al., 2014). Diketahui bahwa bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan bakteri patogen seperti *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella*, sehingga dengan potensi yang dimiliki dapat meningkatkan keamanan pangan. Sementara dalam bidang medis, seiring meningkatnya resistensi terhadap antibiotik konvensional, bakteriosin muncul sebagai kandidat menjanjikan, yang dapat dijadikan agen terapeutik baru (Cheruvari dan Kammara 2024). Selain itu, bakteriosin juga bekerja dengan cara yang sangat spesifik, yang memungkinkan bakteriosin ini menargetkan bakteri patogen tanpa mengganggu mikrobiota normal manusia, hal ini berbeda dengan antibiotik yang memiliki spektrum luas (Barbosa et al., 2021).

Bakteri penghasil bakteriosin dapat diidentifikasi menggunakan gen 16S rRNA, yang banyak digunakan dalam klasifikasi bakteri karena memiliki titik konservatif dan variabel serta terdapat pada hampir semua prokariota (Janda dan Abbot, 2017). Gen ini memungkinkan konstruksi pohon filogenetik untuk menentukan hubungan evolusioner. Pencarian bakteri penghasil bakteriosin didukung oleh meningkatnya resistensi antibiotik, yang menjadi suatu ancaman kesehatan global melalui vektor manusia, hewan, dan pangan (Naghavi et al., 2024). Sehingga, bakteriosin menjadi alternatif yang menjanjikan, bakteriosin ini bekerja melalui mekanisme unik seperti pembentukan pori atau penghambatan sintesis dinding sel. Senyawa ini bersifat selektif, ramah lingkungan, dan kurang toksik dibandingkan antibiotik konvensional (Heilbronner et al., 2021).

Sebelum bakteriosin dapat diproduksi, sangat penting untuk mengidentifikasi spesies bakteri potensial penghasil bakteriosin sehingga memungkinkan propagasi

dan kultivasinya untuk produksi bakteriosin (Abbasiliasi et al., 2017). Bakteri potensial penghasil bakteriosin dalam penelitian ini diisolasi dari terasi udang rebon (*Acetes*). Terasi merupakan produk fermentasi udang rebon secara tradisional yang kaya akan komunitas mikroba yang beragam, khususnya bakteri asam laktat (BAL) dari golongan *Bacillus spp.*, bakteri ini dikenal sebagai penghasil bakteriosin (Herlina et al., 2024). Kandungan proteinnya yang tinggi dalam terasi serta konsentrasi garamnya menciptakan tekanan selektif yang mendukung pertumbuhan mikroba penghasil bakteriosin, hingga terjadi proses fermentasi alami tanpa penambahan kultur starter (Kobayashi et al., 2016). Sehingga dalam hal ini terasi menyediakan lingkungan mikro yang khas (karena fermentasi alami, kandungan garam, protein, dan komunitas mikroba tertentu) yang menjadikannya tempat potensial untuk menemukan strain bakteri baru penghasil bakteriosin (Helmi et al., 2024). Kajian ini belum banyak mendapat perhatian dalam isolasi strain-strain baru penghasil bakteriosin.

Beberapa penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa produk laut hasil fermentasi, seperti *Pla-som* (ikan fermentasi dari Thailand) dan *Kung-chai* (udang fermentasi), mengandung bakteri penghasil bakteriosin. Temuan ini menunjukkan bahwa produk-produk tradisional tersebut dapat menjadi sumber alami senyawa antimikroba yang berpotensi dimanfaatkan dalam bidang pangan maupun Kesehatan (Kim dan Austin 2008; Hwanhlem et al., 2011; Jiang et al., 2022). Temuan terbaru juga menunjukkan BAL dari produk ikan fermentasi mampu menghambat patogen seperti *Listeria monocytogenes* (Elidrissi et al., 2023), dengan strain yang diisolasi dari ikan gabus dan kepiting bakau yang memperlihatkan aktivitas antimikroba yang kuat (Du et al., 2024; Pramono et al., 2023). Sementara, penelitian mengenai bakteriosin dari terasi udang rebon asal Indonesia masih terbatas, dan potensi mikrobiota endemiknya belum banyak dieksplorasi. Penelitian ini berupaya mengisi *gap* penelitian tersebut dengan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil bakteriosin dari terasi udang rebon serta mengevaluasi aktivitas antimikrobanya melalui uji konsentrasi hambat minimum (KHM). KHM adalah konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba, hal ini sangat penting untuk menilai potensi antimikroba (Darbandi et al., 2022). Penggunaan bakteriosin kasar dalam penelitian ini menjadi dasar untuk pengembangan bakteriosin murni sebagai pengawet alami dari produk fermentasi tradisional Indonesia di masa mendatang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil bakteriosin dari terasi udang rebon serta mengevaluasi nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) terhadap bakteri pembusuk pada udang. Prospek penelitian ini berkontribusi pada kemajuan bioteknologi dan metode produksi berbasis mikroorganisme dengan menitikberatkan pada pengembangan bakteriosin sebagai bagian integral dari solusi global terhadap krisis resistensi antibiotik.

2.3 Metode

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan September – bulan Desember 2024. Penelitian dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Sorong dan di laboratorium Biologi, FMIPA Universitas Bengkulu. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah bakteri yang diisolasi dari terasi udang rebon. Terasi udang rebon yang diproduksi pada skala industri rumah tangga di Papua Barat Daya, Indonesia.

Prosedur Penelitian

Persiapan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah terasi udang rebon (*Acetes* spp.) yang diproduksi oleh industri rumah tangga di Kabupaten Sorong Selatan, Papua Barat Daya. Terasi dibuat secara tradisional menggunakan kadar garam sebesar 20% (w/w). Pengambilan sampel dilakukan sebanyak satu kali (*single sampling*) karena tujuan utama penelitian adalah isolasi bakteri penghasil bakteriosin, bukan analisis variasi *batch* produksi. Satu *batch* terasi yang homogen dianggap telah mewakili kondisi mikrobiologis fermentasi terasi udang rebon.

Sampel diambil segera setelah proses fermentasi selesai (*fresh fermented* terasi) untuk memastikan bahwa populasi bakteri, khususnya bakteri potensial penghasil bakteriosin, masih berada pada fase aktif dan belum mengalami penurunan viabilitas akibat penyimpanan jangka panjang. Terasi udang rebon diambil secara aseptik menggunakan alat steril dan dimasukkan ke dalam wadah plastik steril yang tertutup rapat. Selanjutnya, sampel disimpan dalam *cool box* pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama proses transportasi menuju laboratorium untuk meminimalkan perubahan komposisi mikrobiologis dan menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan yang tidak diinginkan.

Isolasi bakteri

Pada tahap isolasi bakteri, semua peralatan seperti cawan petri, labu erlenmeyer, pipet ukur, pinset, dan lainnya terlebih dahulu disterilkan. Medium De Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRSA) disiapkan dengan melarutkan 68,2 gram dalam 1 L akuades, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sampel terasi (berasal dari udang rebon) ditimbang sebanyak 1 gram dan diencerkan dalam 9 mL larutan fisiologis natrium klorida (NaCl) 0,9%, sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya, 1 mL dari pengenceran 10^{-1} dipindahkan untuk dibuat pengenceran seri berikutnya hingga 10^{-2} dan 10^{-3} . Dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), sebanyak 1 mL ditanam pada cawan petri yang berisi medium MRSA. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu ruang (29°C) selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan morfologi, dan satu koloni dari setiap cawan sampel dipilih untuk identifikasi lebih lanjut dan diberi kode isolate TRS1, TRS2 dan TRS3 (Kanauchi, 2019).

Sterilisasi alat dan bahan serta pembuatan media pertumbuhan bakteri penghasil bakteriosin

Alat yang digunakan seperti cawan petri, tip mikropipet, batang pengaduk, tabung reaksi, erlenmeyer, blank disk, tabung eppendorf, dan lain-lain di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media pertumbuhan bakteri penghasil bakteriosin adalah media de Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRSA). Media MRSA digunakan dalam menumbuhkan atau merekultur isolate bakteri penghasil bakteriosin. Media MRSA ditimbang sebanyak 67,15 gram kemudian dilarutkan ke dalam air 1 L aquades, larutan media dipanaskan pada *hotplate stirrer* hingga larut, media yang telah larut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya media tersebut ditunggu suhunya menurun mencapai 45-50°C sebelum dituangkan ke dalam cawan petri.

Identifikasi bakteri

Sampel bakteri yang telah diisolasi dari terasi udang rebon, terpilih 3 jenis isolate atau sampel bakteri (TRS1, TRS2 dan TRS3). Prosedur identifikasi bakteri dilakukan mulai dari isolasi DNA, amplifikasi gen 16s rRNA isolat sampel bakteri serta sekuensing dan konstruksi filogenetik.

Isolasi DNA bakteri

Biakan sampel bakteri disentrifugasi 1,5 ml selama 10 menit pada rotasi 8000 rpm untuk mendapatkan DNA bakteri. Pellet bakteri yang telah disentrifugasi dicuci dengan buffer STE, proses ini dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Pellet yang dihasilkan ditambahkan buffer STE dan enzim lisozim kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan enzim proteinase-K dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit. Selanjutnya, ditambahkan *cetyltrimethylammonium bromide* dalam larutan NaCl dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Setelah itu, ke dalam larutan ditambahkan fenol:kloroform (25:24) kemudian disentrifugasi pada rotasi 12000 rpm selama 10 menit. *Supernatant phase* dipindahkan ke tabung dan ditambahkan 0,6 kali volume isopropanol dan 20 µL natrium asetat, kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 12 jam. Larutan disentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit. Pellet dicuci dengan 1 mL alkohol 70%. DNA dikeringkan selama 1 jam untuk menghilangkan alkohol. Selanjutnya, dilarutkan dalam *distilled deionized water*, modifikasi dari metode (Sambrook dan Russell, 2001).

Amplifikasi gen 16s rRNA isolat sampel bakteri

Gen 16S rRNA dari DNA genom diperbanyak menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan primer forward 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan primer reverse 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi et al., 1998). Komposisi reaksi PCR terdiri dari 0.5 µL enzim La Taq DNA polymerase, 25 µL 2x buffer GC, 8 µL campuran dNTP, 1,5 µL masing-masing primer (10 pmol), 9,5 µL ddH₂O, dan 4 µL DNA template.

Kondisi PCR yang digunakan adalah pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, diikuti dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, *elongation* pada suhu 72°C selama 1 menit 10 detik, dan *post* PCR pada suhu 72°C selama 7 menit, dengan total siklus sebanyak 30 siklus. Setelah amplifikasi, produk DNA PCR dipisahkan menggunakan elektroforesis pada mini-gel agarosa 1% dengan tegangan listrik 75 Volt selama 45 menit. DNA kemudian divisualisasikan di atas UV transluminator menggunakan pewarna *ethidium bromida* (EtBr) pada sistem dokumentasi axygen gel (Brzoska dan Hassan, 2014).

Sekuensing dan konstruksi filogenetik

Hasil sekuensing disusun menggunakan perangkat lunak ChromasPro versi 1.5, selanjutnya dibandingkan dengan data genom pada National Center for Biotechnology Information (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Data ini diargumentasikan dengan sekuen-skuen menggunakan perangkat lunak MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) selanjutnya, pohon filogenetik menggambarkan tingkat kekerabatan antara mikroorganisme menggunakan metode *neighbor joining tree* dengan 1000 ulangan bootstrap (Felsenstein, 1985).

Kultur isolat bakteri penghasil bakteriosin

Isolate bakteri penghasil bakteriosin yang terpilih dikultur atau diperbanyak pada media Media MRS Agar (De man rogosa and sharpe), kemudian kultur isolate bakteri tersebut digunakan untuk memproduksi *crude* bakteriosin. Media MRS Agar ditimbang 67,15 gram dan dilarutkan ke dalam aquades 1000 mL, selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media MRS Agar dituang ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 10 mL, lalu media dimiringkan dan ditunggu hingga memadat. Isolate bakteri digores, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Produksi Bakteriosin

Masing-masing isolat bakteri penghasil bakteriosin (TRS1, TRS2, dan TRS3) diinokulasikan ke dalam 500 mL media MRS Broth (55,15 gram/1000 mL) (Perez et al., 2022) dan ditambahkan dengan 0,5% CaCO₃ (Ooi et al., 2015), kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam dengan menggunakan shaker dengan rotasi 80 rpm. Kultur bakteri sebanyak 500 mL dipisahkan antara supernatan dan pellet dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 15 menit, selanjutnya supernatan disaring menggunakan *millipore* 0,22 µm sehingga hasil saringan yang diperoleh ialah supernatan netral bebas sel atau *crude* bakteriosin (Hoover dan Steenson, 2014).

Uji Aktivitas Antibakteri Bakteriosin

Bakteriosin yang telah diproduksi berupa ekstrak kasar larutan bakteriosin atau biasa disebut *crude* bakteriosin. Bakteriosin TRS1, TRS2, dan TRS3 dilakukan

uji konsentrasi hambat minimum (KHM) yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari *crude* bakteriosin dalam menghambat bakteri umum atau bakteri indikator adalah total bakteri pembusuk yang terdapat pada udang (bakteri indikator merujuk pada bakteri yang diisolasi dari udang putih, yang digunakan untuk mengidentifikasi proses pembusukan pada udang, bakteri ini dianggap sebagai salah satu penyebab utama pembusukan karena kemampuannya berkembang biak pada udang yang busuk). Sampel *Crude* bakteriosin dilarutkan dalam metanol 30% modifikasi dari Taylor et al., (2007) untuk menghasilkan konsentrasi bakteriosin seperti pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Konsentrasi crude bakteriosin pada uji konsentrasi hambat minimum (KHM)

Konsentrasi (%)	Jumlah <i>Crude</i> Bakteriosin (μ L)	Jumlah Pelarut Metanol 30% (μ L)
100	1000	-
50	500	500
25	250	750
12,5	125	875
6,25	62	938
3,125	31	969
1,56	15	985
0,78	7	993
0,39	3	997
0,19	1	999
0,09	0,9	999,1
0	-	1000

(Modifikasi; Apriyanto et al., 2014)

Uji konsentrasi hambat minimum pada bakteri indikator, dilakukan dengan metode sebar pada media nutrisi agar dan diletakkan blank disk yang selanjutnya masing-masing setiap variasi konsentrasi diambil sebanyak 15 μ L ditetaskan pada blank disk berukuran 6 mm dengan ketebalan 2 mm, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang 29°C kemudian zona bening yang terbentuk diukur serta aktivitas penghambatan crude bakteriosin dihitung dengan persamaan (Sharma et al., 2011) sebagai berikut:

Aktivitas zona hambat (mm)

$$= \text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter Paper disc (mm)}$$

Analisis Data

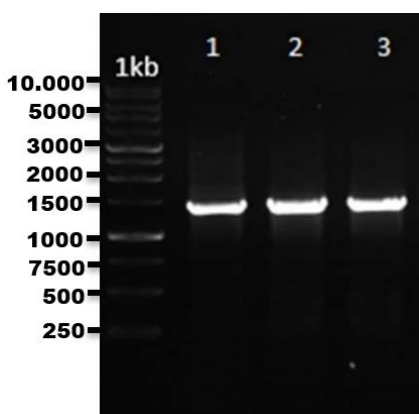
Analisis data dilakukan secara deskriptif meliputi gambaran morfologi koloni isolat bakteri penghasil bakteriosin, bentuk sel bakteri penghasil bakteriosin, sifat Gram sel bakteri penghasil bakteriosin, golongan bakteri penghasil bakteriosin, hasil uji konsentrasi hambat minimum (KHM).

2.4 Hasil dan Pembahasan

Tiga isolat bakteri berbeda yang diperoleh dari terasi udang rebon (*Acetes*), menunjukkan potensi untuk memproduksi bakteriosin, teridentifikasi sebagai kelompok genus *Bacillus* (Tabel 2.2). Identifikasi ini didasarkan pada hasil penyelarasan (*alignment*) sekuens gen 16S rRNA terhadap data yang tersedia di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sekuens gen 16S rRNA yang bersesuaian ditampilkan pada Tabel 2.2, Tabel 2.3, Gambar 2.1 sedangkan pohon filogenetik di antara isolat-isolat tersebut divisualisasikan pada Gambar 2.2, Gambar 2.3, dan Gambar 2.4.

Berdasarkan analisis filogenetik, sampel TRS1 menunjukkan identitas sebesar 99,69% dengan hasil identifikasi sebagai *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, sebagaimana ditunjukkan dalam pohon filogenetik pada Gambar 2.2. Sementara itu, analisis filogenetik diidentifikasi sampel TRS2 sebagai *Bacillus nitratisreducens* strain MCCC 1A00732 dengan kemiripan sebesar 99,77%, sebagaimana ditunjukkan pada pohon filogenetik di Gambar 2.3. Selanjutnya, sampel TRS3 teridentifikasi sebagai *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 dengan identitas sebesar 99,61% (Gambar 2.4).

Pemilihan *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1 dalam penentuan jenis spesies karena berdasarakan karakteristik morfologi koloninya, yang selanjutnya dilakukan pengujian konsentrasi hambat minimum (KHM), morfologi *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1 berbeda dengan *Bacillus nitratisreducens* strain MCCC 1A00732 dan *Bacillus luti* strain MCCC 1A00359. Perbedaan tersebut, meliputi variasi bentuk, tekstur, warna, dan tepi koloni, menjadi faktor penting dalam proses seleksi. Hasil uji KHM pada berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 (TRS1), *Bacillus nitratisreducens* strain MCCC 1A00732 (TRS2), dan *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 (TRS3) memperlihatkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator, sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 2.4 dan Gambar 2.5.



Gambar 2.1. Amplifikasi PCR gen 16S rRNA menggunakan primer 63F dan 1387R; M = penanda DNA ladder 1 kb: 1. sampel TRS1, 2. sampel TRS2, dan 3. sampel TRS3.

Tabel 2.2. Hasil pensejajaran sekuen gen 16 sRNA isolat bakteri terhadap data yang tersedia di NCBI (BLASTN)

Nama Isolat	Description	Max Score	Total Score	% Query Cover	E Value	% Identity	Accession number
TRS1	<i>Bacillus tropicus</i> strain MCCC 1A01406	2359	2359	100	0.00	99.69	NR_157736.1
	<i>Bacillus nitratireducens</i> strain MCCC 1A00732	2359	2359	100	0.00	99.69	NR_157732.1
	<i>Bacillus luti</i> strain MCCC 1A00359	2359	2359	100	0.00	99.69	NR_157730.1
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	2353	2353	100	0.0	99.61	NR_074540.1
	<i>Bacillus rhizoplanæ</i> strain JJ-63	2242	2242	100	0.0	98.06	NR_181926.1
	<i>Bacillus pseudomycoide s</i>	2239	2239	100	0.0	97.83	NR_114422.1
TRS2	<i>Bacillus nitratireducens</i> strain MCCC 1A00732	2350	2350	100	0.00	99.77	NR_157732.1
	<i>Bacillus luti</i> strain MCCC 1A00359	2350	2350	100	0.00	99.77	NR_157730.1
	<i>Bacillus albus</i> strain MCCC 1A02146	2350	2350	100	0.00	99.77	NR_157736.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 101235	2333	2333	99	0.0	99.53	NR_112780.1
	<i>Bacillus mycoide s</i> strain ATCC 6462	2305	2305	100	0.0	99.14	NR_115993.1

	<i>Bacillus bingmayongensis</i> strain FJAT-13831	2298	2298	100	0.0	98.99	NR 148 248 1
	<i>Bacillus paramycoides</i> strain MCCC 1A04098	2357	2357	100	0.00	99.61	NR 157 734 1
	<i>Bacillus tropicus</i> strain MCCC 1A01406	2351	2351	100	0.00	99.54	NR 157 736 1
	<i>Bacillus nitrareducens</i> strain MCCC 1A00732	2351	2351	100	0.00	99.54	NR 157 732 1
TRS 3	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010	2346	2346	100	0.0	99.46	NR 115 714 1
	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365	2340	2340	100	0.0	99.38	NR 157 735 1
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	2329	2329	100	0.0	99.23	114 581 1

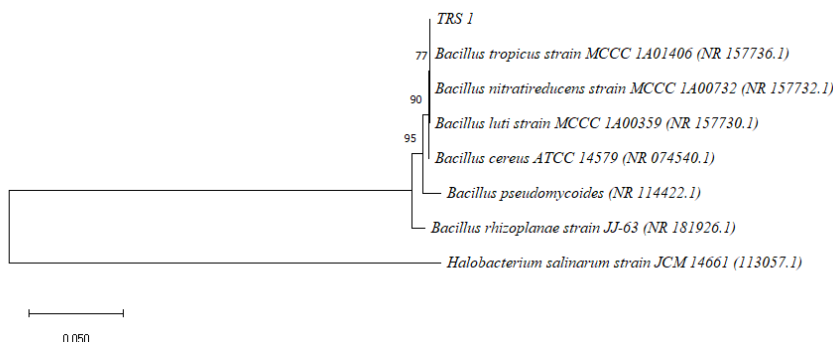
Tabel 2.3. Urutan sekuen gen 16S rRNA dari tiga sampel yang potensial menghasilkan bakteriosis

Nama isolat	Species name	The 16S rRNA gene sequence			Accession number from NCBI
TRS1	<i>Bacillus tropicus</i> strain MCCC 1A01406	gctccttattgaattagcggcggaacgggtgaattaaacacgtgggttaacctgcccataagactgggaataactcggggaaacccggggcctaataccggata acattttgaaacccgattggttcgaattgaaagggcggttcggcgctgnntcacttatgagtggaaccccgctggcattagcttagtggagtaagcggt caccagagcagcaatgcttagcggcaccctgagagggctgaatcgccacacttgagactgaaacacggcccgacactcttagcgagagcagcaatgagga tcttccgcaatgacgaanaagctctgacggagcagcccgccgctgagtgatgaaggcttccgggtggttaaaactctgtgttagggaggaacagatgctag tggatgaagctggcacccttgagcgttacttaacagagaagccagcgttaactagctggcagacggccgggttaactagctaggtgggcaacgcttattcgga attatttggggcttaagccgcgcgagcgtggtttcttaagctcgtatgtgaaagccacggctcaacgctgggaggtcattggaacgtggagacgttagt ggagagagggaagtggaattccatgtgtgtagcgtgsmatgctggtagagatagtagaggaacacacagtgccgaaaggcgacttcttggttcttctaacctac actgagggccgaagaggtggggagcagcaaggaattagatagactgtgtgtagtcacggccgttaagcagtagctggtaggttttagagaggttttcggcgct tagctgtgaagttaacgatttaacgactacggcctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaagggaattgacggggcgccgacagagcgctggag catctgtgcttaatttagtgagcaacggcggaagactttacagcgtttgagactcttgacacacactgagagatagcggttctcctggggagagaggtgac agcgtgtgcatgtgtgtgctacgctcgtgtgtgtgagatgttggttgaagtcccgcaacgagcggcaaccttggatctttgcatgtttgcatttaagtgtgg cactgttaagtgtagctggcggtgacaaacccagagagagctggggatgactcnaattcatatggcccttagtagctgggctacacagctgtctacatg gagcgtacaaagacttgcaaaccccgagagctgagcgttaattcattatmaacgcttctcaattgtggattgtgagctgcaactggcctacatgcaactgg aattcgcctagattcggcgattcagc			PV759527.1
TRS2	<i>Bacillus nitrareducens</i> strain MCCC 1A00732	gaaacttaccggcgagcgttgatatacacgtgggttaacctgcccataagactgggataactcgggaaacccggggcctaataccgataacatttt gaacccgctaggttcgaattgaaagggcggttcggcgctgacttatgagtggaaccccgctggcattagcttagtggtaggtaagcgcttccacaaaggc aaagatgctgtagcgaacttgagagaggtgattgctgacactgggaacttgagagagcgccagactcttagggagagcagcaatagggatgttccgca attgagcaagaaactgacggagcaacggcggtgagtgattgaaggcttccgggtcgttaaaactctgtgttagggagaaacaaagctgattgataa gctggcactctgacggtagcttaacgaagaaagccagcgttaactcgtgtagcagcagcccggttaatacgttaggtggcagagcttattcggcaattatttg gctgtaaacggccgcagagctggttttttaagcttattgtgaaagccacgctcgaacgctggagagcttattgaaactgggaagcttgagtgagcga aggaagtggaattccattgtgtgagcgtgaaatgctgtagagatattgaggaacacagctggcgaagcgaacttcttggtctgtgactgaactgagag cgcgaaagcgtggggagcaacagagattagatnccctggttagtcacggccttaagagatagatgcttagttagttagagaggttgcggccttttagtgc gaatttaagcatttaagcactcggcgtggggagtagcggcgcaagcgtgaaactcaaggaattgacggggcgcccgacagagcggttgtagcattgtg ttatcttagcagagagcggaagaaactttagcagctttagacattctttagacacccagagatagagcttctcctggagacagagtagcagagtggt gactggtgtcgtgtagcactcgtgtgtgtgattgtgggttaagctcggcgaaccccttgaattgttagtgcacattcaattcattggtgcacttga ggtagcttcgggtgacaaacggagagaggtgggtagagcgaactaatcatatgccccttattgacactgggctggcgtgactacattgagagcgtgac aaagactgtgaagcactgagcgtggagcttaattcattanaagcgttctcaattgtgagcttagttagcgaactggcctacattgaaactggatgctgag taantcggcattcagc			PV759528.1
TRS 3	<i>Bacillus paramycoides</i> strain MCCC 1A04098	gctccttattgaattagcggcggaacgggtgaattaaacacgtgggttaacctgcccataagactgggataactcggggaaacccggggcctaataccgata acattttgaaacccgattggttcgaattgaaagggcggttcggcgctgacttatgagtggaaccccgctggcattagcttagtggtaggtaagcggttca ccagggcagcaatgcttagcggcaccctgagagggctgtagcggcaccactggagctgagagcagccggccagactcttagcggagggcagcagtaggagaa ttccgcaatgagcgaagctttagcggagcagcagcccgctgtagatgtagagcgttttcgggtggttaaaactctgtgttagggaggaacagatgctag tgaatttagctggcacccttagcgtgacttaacgaagaaagccagcgttaactacgtgacacacccggcggttaactagcttagctggcagcgttattccggaa ttaatggcgttaagggcgccgagcgtggttttgaagtgatgtgaaagcccgccgctcaacgctggaggtctattgggaactggagacttgagtg cagaagaggaagtggaattccattgtgtgtagcggtaaatgctgtagagatagtagggaacacacagctggcgagggcacttttgctgtgtaactgac ctgaagcccggaagcgttggggagcaaacagagtagatagactcgtgctagttaacggcgttaaacagtagcttagttagttagagaggttgcggcgttt agctgtgaaatgaaacttgaacatttgaacattcctcgtggagagtagcggcgcaagcgtgaaactcaaggaatttagcggggcgccgacagagcgttgagc attgtggtttaatttgagcaacgggaagaaacttagcagctgttgaacattctgagaaacccctagagatagaggttctcttccggagacagagtagaca gctggtgctgattgtgtgtgtgactgctgtgtgtagatgttgggttaagtcggcgcaacagcagcgttgattgttagtggcattatttagttgggg actcttaagctgactcggcgtagcaaacggagagaggtgggtagtagctgaactcatgacccctttagactggggctacacagctgctacatggt agctgtagaagagctgcaagcggcgagctggagcttaattcattanaacgcttctcattgctggatttagagctgcaactgctcattgagagcgtgga actgcttaatactcggattcagcgtg			PV759529.1

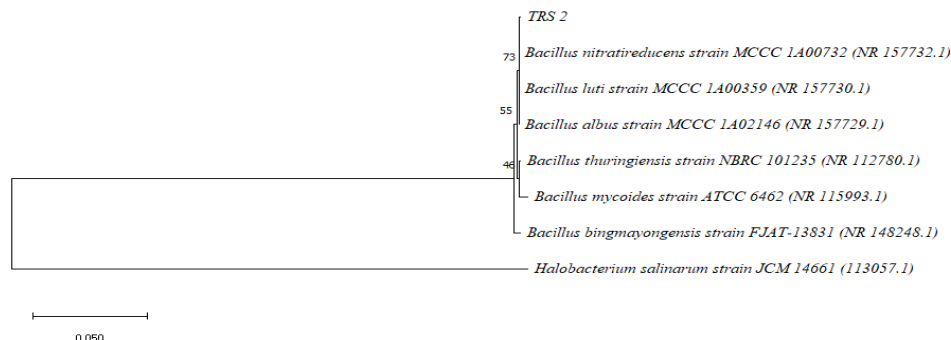
Tabel 2.4. Aktivitas penghambatan bakteriosin kasar dari isolat *Bacillus* potensial yang berasal dari terasi udang rebon (*Acetes*) terhadap bakteri indikator (total bakteri pembusuk pada udang)

Konsentrasi (%)	Bakteriosin kasar (μL/mL)	Diameter zona hambat (mm) aktivitas bakteriosin kasar terhadap bakteri pebusuk pada udang					
		TRS1	Stedev	TRS2	Stedev	TRS3	Stedev
100	1000	16,3	2,47	8,5	2,47	13,2	0,64
50	500	12,8	0,78	5,0	0,49	12,3	2,69
25	250	11,7	0,85	4,3	0,57	8,5	1,20
12,5	125	10,5	0,85	3,5	0,49	6,8	1,27
6,25	62	9,3	0,92	2,8	0,57	5,0	0,49
3,125	31	8,0	0,92	2,0	0,21	4,3	0,35
1,56	15	6,7	0,99	1,7	0,35	3,8	0,21
0,78	7	5,3	0,92	1,2	0,85	3,5	0,85
0,39	3	4,0	1,20	0	-	2,3	0,92
0,19	1	2,3	1,63	0	-	0	0,71
0,09	0,9	0	-	0	-	0	-
0	-	0	-	0	-	0	-

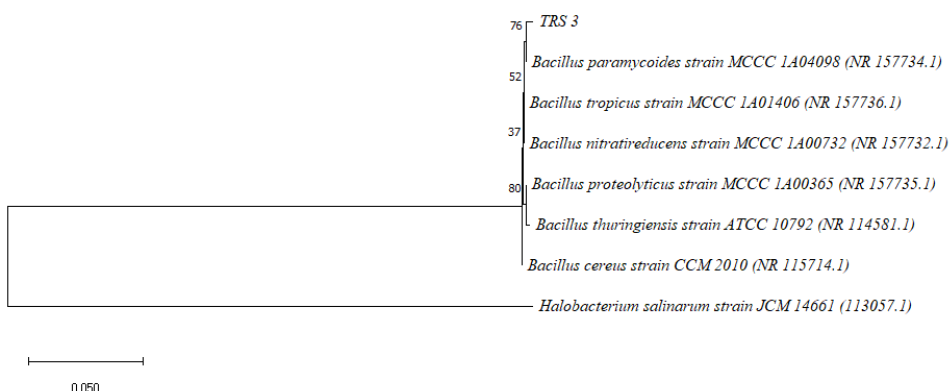
Catatan: TRS1 merepresentasikan bakteriosin kasar yang diproduksi oleh *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, TRS2 merepresentasikan bakteriosin kasar yang diproduksi oleh *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732, dan TRS3 merepresentasikan bakteriosin kasar yang diproduksi oleh *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098. Nilai 1–7 μL/mL yang diberi lingkaran menunjukkan KHM (Konsentrasi hambat minimum).



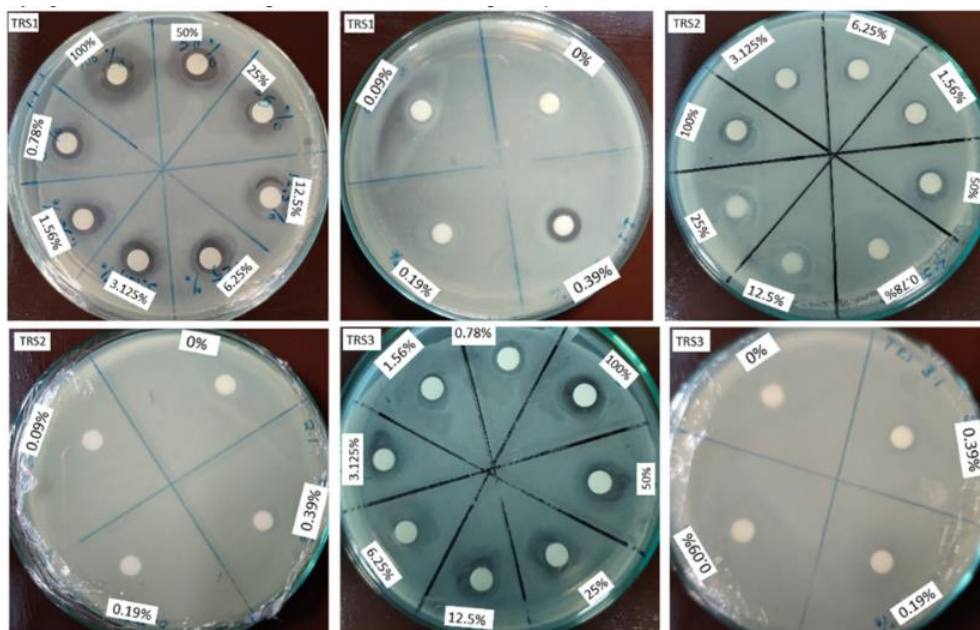
Gambar 2.2. Pohon filogenetik dari sampel TRS1 identik dengan *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1



Gambar 2.3. Pohon filogenetik dari sampel TRS2 identik dengan *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 TRS2



Gambar 2.4 Pohon filogenetik dari sampel TRS3 identik dengan *Bacillus paramycooides* strain MCCC 1A04098 TRS3



Gambar 2.5. Daya hambat crude bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1; *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 TRS2; *Bacillus paramycooides* strain MCCC 1A04098 TRS3, terhadap bakteri indikator

Hasil penyelarasan sekuens gen 16S rRNA (Tabel 2.2; Tabel 2.3), amplifikasi PCR gen 16S rRNA (Gambar 2.1), dan pohon filogenetik (Gambar 2.2; Gambar 2.3; 2.4) menunjukkan bahwa isolat TRS1 identik dengan *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732, dan *Bacillus luti* strain MCCC 1A00359, dengan persentase kemiripan yang sama yaitu 99,69%. Isolat

TRS1 juga ditemukan memiliki kemiripan dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579 sebesar 99,61%, *Bacillus rhizoplanae* strain JJ-63 sebesar 98,06%, dan *Bacillus pseudomycoides* sebesar 97,83%.

Isolat TRS2 juga ditemukan memiliki nilai kesamaan identik sebesar 99,77% terhadap tiga strain, yaitu *Bacillus nitratreducens* strain MCCC 1A00732, *Bacillus luti* strain MCCC 1A00359, dan *Bacillus albus* strain MCCC 1A02146. Sementara itu, tiga strain lainnya menunjukkan nilai identitas kesamaan yang lebih rendah, sehingga disimpulkan bahwa isolat TRS2 diidentifikasi sebagai *Bacillus nitratreducens* strain MCCC 1A00732. Identifikasi ini juga didasarkan pada pertimbangan kesamaan morfologi koloni, nilai persentase identik sebesar 99,77% (Tabel 2.2), serta kedekatan isolat TRS2 dengan *Bacillus nitratreducens* strain MCCC 1A00732 dalam pohon filogenetiknya (Gambar 2.3).

Isolat TRS3 ditemukan memiliki nilai kesamaan identitas tertinggi dengan *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 sebesar 99,61%, dibandingkan dengan lima strain lainnya (Tabel 2.2). Kedekatan isolat TRS3 dengan *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 dapat diamati pada (Gambar 2.4). Meskipun identitas genetik (99,69% atau 99,7%) menunjukkan kesamaan pada beberapa strain, keputusan untuk memilih satu strain tertentu sebagai acuan identifikasi didasarkan pada: nilai skor tertinggi (*Max/Total Score*), nilai E (*E-value*) sebesar 0,00 pada semua kecocokan, dengan prioritas pada keselarasan (*alignment*) yang paling signifikan dan konsisten, serta stabilitas nomenklatur dan frekuensi penggunaan strain tersebut dalam literatur sebelumnya (Tabel 2.2).

Berdasarkan nilai identitas kesamaan tersebut, disimpulkan bahwa isolat TRS1 diidentifikasi sebagai *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, meskipun terdapat dua strain lain dengan nilai identitas yang sama. Identifikasi ini ditentukan tidak hanya berdasarkan persentase kesamaan, tetapi juga pada kedekatan isolat TRS1 dengan *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, serta kesamaan morfologis karakteristik koloni TRS1 dengan *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406. Sementara itu, kesamaan dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus rhizoplanae* strain JJ-63, dan *Bacillus pseudomycoides* menunjukkan nilai identitas yang lebih rendah dibandingkan tiga strain sebelumnya (Tabel 2.2).

Karakteristik *Bacillus tropicus* diketahui sebagai bakteri Gram-positif dengan potensi aplikasi dalam bioteknologi, khususnya dalam produksi enzim dan sintesis senyawa bioaktif (Duhan et al., 2020). *Bacillus nitratreducens* dikenal sebagai bakteri yang mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Beberapa strain *Bacillus nitratreducens* juga dilaporkan memiliki sifat probiotik yang dapat bermanfaat dalam bidang pertanian dan akuakultur (Besson et al., 2022). *Bacillus paramycoides* merupakan spesies yang memiliki kemiripan dengan *Bacillus cereus* tetapi dengan karakteristik genetik yang berbeda. Bakteri ini telah dilaporkan mampu menghasilkan enzim dan senyawa bioaktif (Ren et al., 2022).

Hasil isolasi bakteri dari terasi udang rebon (*Acetes*) menunjukkan potensi dalam memproduksi bakteriosin, ketiga isolat bakteri tersebut mampu menghambat bakteri indikator. Hal ini sejalan dengan temuan sebelumnya bahwa bakteriosin kasar asal bakteri dari terasi udang mampu menghambat bakteri patogen *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium*. Selain itu, bakteriosin tersebut stabil hingga 121°C, dan tahan terhadap pH 2 hingga pH 6 (Pato et al., 2022). Sementara dalam penelitian ini, sampel bakteri yang berasal dari terasi udang diidentifikasi sebagai *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 untuk kode sampel TRS1, *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 untuk TRS2, dan *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 untuk TRS3 (Tabel 2.2; Gambar 2.2–2.4).

Bakteriosin kasar yang dihasilkan ketiganya memperlihatkan efek penghambatan terhadap bakteri pembusuk pada udang. Hasil uji KHM menunjukkan bahwa bakteriosin TRS1 memiliki potensi penghambatan tertinggi dibandingkan TRS2 dan TRS3. Pada konsentrasi (0,19%), bakteriosin TRS1 masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk pada udang dengan membentuk zona bening (halo) sebesar 2,3 mm. Hal ini mengindikasikan bahwa TRS1 memiliki aktivitas antimikroba yang kuat dan efisien pada konsentrasi minimal, yang mencerminkan afinitas tinggi terhadap target sel bakteri.

Bakteriosin TRS3 menunjukkan aktivitas penghambatan yang sebanding dengan TRS1, namun membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi (0,39%) untuk menghasilkan zona halo dengan diameter yang sama (2,3 mm). Kondisi ini menunjukkan bahwa meskipun efektivitas antimikroba TRS3 cukup baik, daya hambatnya relatif lebih rendah dibandingkan TRS1, sehingga memerlukan konsentrasi dua kali lipat untuk mencapai tingkat inhibisi yang setara. Sementara itu, bakteriosin TRS2 menunjukkan aktivitas antimikroba paling rendah, ditunjukkan oleh terbentuknya zona halo yang lebih kecil (1,2 mm) meskipun pada konsentrasi yang lebih tinggi (0,78%). Hal ini mengindikasikan bahwa TRS2 memiliki potensi penghambatan yang lebih lemah, yang kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan karakteristik molekuler bakteriosin, seperti struktur peptida, stabilitas, atau mekanisme interaksi dengan membran sel bakteri target.

Secara keseluruhan, perbedaan diameter zona halo pada masing-masing isolat mencerminkan variasi potensi antimikroba antar bakteriosin yang dihasilkan, di mana TRS1 merupakan isolat paling potensial untuk dikembangkan sebagai pengawet alami karena efektivitasnya pada konsentrasi rendah (Tabel 2.4; Gambar 2.5). Hal ini sejalan dengan karakter bakteriosin sebagai peptida antimikroba yang larut dan mampu berdifusi dalam media padat. Jika dibandingkan dengan bakteriosin P7 dari *Bacillus velezensis* G7 yang diisolasi pada tahun 2025 dari tanaman mangrove menunjukkan nilai KHM sekitar 30 µg/mL dan efektif terhadap *Staphylococcus aureus* (Li et al. 2025), sementara nilai KHM yang diperoleh dalam penelitian ini, yaitu 1 µL/mL untuk TRS1 (*B. tropicus*) dan 3 µL/mL TRS3 (*B. paramycoides*), serta 7 µL/mL untuk TRS2 (*B. nitratireducens*), artinya bakteriosin yang dihasilkan berada dalam kisaran yang potensial, meskipun dengan mempertimbangkan perbedaan satuan konsentrasi. Bakteriosin kasar yang dihasilkan oleh isolat bakteri yang berasal dari terasi, mampu mencapai tingkat penghambatan. Beberapa hasil penelitian yang menunjang diantaranya bakteriosin yang berasal dari *Bacillus*, seperti thucin A1 dari *B. thuringiensis* P86 (2022), juga menunjukkan aktivitas kuat terhadap patogen pangan bakteri Gram-positif (Zhang et

al., 2022), selain daripada itu didukung pula oleh bakteriosin PCM74 yang terbukti memiliki efek anti-*Listeria* yang kuat (Ma et al., 2025).

Standar yang diakui FAO/WHO dan FDA-GRAS kisaran konsentrasi legal dan efektif untuk pengawet pangan seperti bakteriosin jenis nisin, pediocin, plantaricin dalam mengawetkan produk perikanan, daging olahan dan produk susu memiliki kisaran antara 10-10000 ppm apabila bakteriosin efektif ≤ 1000 ppm, maka daya aplikasinya sangat kompetitif secara internasional (Delves et al., 1996; Galves et al., 2007).

Jika dibandingkan dengan bakteriosin kasar yang diperoleh dalam penelitian ini, yang menunjukkan nilai KHM TRS1 sebesar 1 $\mu\text{L/mL}$ (~ 1000 ppm) dikategorikan sangat efektif, nilai KHM TRS3 3 $\mu\text{L/mL}$ (~ 3000 ppm) kategori sedang, dan nilai KHM TRS2 7 $\mu\text{L/mL}$ (~ 7000 ppm) masih dapat diterima sesuai standar internasional. Sehingga dapat disimpulkan bahwa TRS1 sangat ideal dalam menghambat bakteri pembusuk pada udang, TRS3 berada dalam kategori menengah, dan TRS2 berada pada kategori cukup efektif. Oleh karena itu, ketiga jenis bakteriosin TRS1, TRS2 dan TRS3 menunjukkan potensi sebagai pengawet alami yang sesuai dengan standar internasional. Perlu diketahui bahwa bakteriosin dari strain yang berasal dari terasi udang masih relatif jarang dieksplorasi. Dengan demikian, temuan ini menyumbangkan kebaruan bahwa *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1; *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 TRS2; *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 TRS3 yang diisolasi dari terasi udang teridentifikasi sebagai penghasil bakteriosin dengan nilai KHM yang terukur, sehingga memberikan informasi mengenai keragaman spesies *Bacillus* dalam menghasilkan peptida antibakteri. Aktivitas TRS1 pada konsentrasi 0,19% (1 $\mu\text{L/mL}$) menunjukkan penghambatan efektif pada konsentrasi rendah, hal ini menunjukkan kriteria yang selaras dengan ambang praktis untuk pengawet alami pada bahan pangan.

Klasifikasi diameter zona hambat, sebagaimana dijelaskan oleh Kowalska-Krochmal dan Dudek-Wicher (2021) yang mengelompokkan penghambatan ke dalam empat tingkat yakni lemah (≤ 5 mm), sedang (6–10 mm), kuat (11–20 mm), dan sangat kuat (≥ 21 mm). Efek penghambatan bakteriosin kasar dari tiga sampel yang menunjukkan zona bening (zona total) atau area transparan sepenuhnya tanpa pertumbuhan bakteri pembusuk pada udang (efek bakterisidal) berada pada konsentrasi 0,39% (TRS1); 1,56% (TRS2); 0,78% (TRS3). Fenomena ini terjadi akibat lisis sel bakteri pembusuk ataupun bakteri patogen. Zona bening yang terbentuk akibat aktivitas bakteriosin terhadap bakteri indikator (baik patogen maupun pembusuk) menunjukkan potensi antimikroba. Secara umum, bakteriosin tersusun atas rantai peptida yang mengalami modifikasi pascatranslasi, seperti pembentukan ikatan disulfida atau siklisasi (Sugrue et al., 2024). Modifikasi struktural inilah yang berperan penting dalam meningkatkan stabilitas dan aktivitas antimikroba (Bahrami et al., 2024).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari ketiga spesies bakteri penghasil bakteriosin potensial, *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 TRS1 memiliki kapasitas penghambatan tertinggi terhadap bakteri pembusuk udang dari konsentrasi 100%-0,39% menunjukkan zona jernih (bakterisida) (Gambar 2.5; Tabel

2.4). Temuan ini sejalan dengan laporan Sardar et al., (2025), yang menyoroti potensi *B. tropicus* sebagai alternatif antibiotik yang efektif dalam peternakan unggas. Studi tersebut melaporkan peningkatan signifikansi dalam performa pertumbuhan, konsumsi pakan, dan rasio konversi pakan dibandingkan kelompok kontrol. Selain itu, sifat probiotiknya dikaitkan dengan peningkatan kualitas daging, peningkatan aktivitas antioksidan, serta perbaikan kandungan gizi dengan protein dan serat lebih tinggi, serta kandungan lemak, abu, dan ekstrak bebas nitrogen yang lebih rendah. Lebih lanjut, *B. tropicus* BB-5 dilaporkan memiliki kemampuan kuat dalam hidrolisis protein dan pati, yang menghasilkan peningkatan total asam, asam laktat, asam asetat, dan senyawa volatil beraroma, karakteristik ini yang meningkatkan kualitas fermentasi *Cupei*, sehingga memperbaiki mutu keseluruhan cuka bekatul Sichuan (Wu et al., 2025). Karena sifat-sifat menguntungkan ini, maka *B. tropicus* telah diusulkan sebagai bakteri probiotik (Shu et al., 2024).

Spesies bakteri potensial lainnya yang teridentifikasi dalam penelitian ini adalah *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 TRS2. Meskipun hasil produksi bakteriosin kasar dari spesies ini menunjukkan kapasitas penghambatan yang lebih rendah dibandingkan strain TRS1, namun TRS2 tetap memperlihatkan efek penghambatan dalam kategori cukup menghambat (Tabel 2.4). Akan tetapi dari hasil-hasil penelitian saat ini, belum tersedia informasi langsung mengenai *Bacillus nitratireducens* sebagai penghasil bakteriosin. Namun, pengetahuan seperti ini dapat diperoleh berdasarkan karakteristik umum spesies *Bacillus* dalam memproduksi bakteriosin. Beberapa strain *Bacillus* yang mampu menghasilkan bakteriosin, seperti *Bacillus* sp. DB407, *B. licheniformis* DB612, dan *B. subtilis* DB821 (Lim 2022). Ada dua strain spesifik yang juga mampu menghasilkan bakteriosin, yaitu *Bacillus tequilensis* ST1962CD dan *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* ST2056CD, bakteriosin jenis surfaktin dan subtilisin yang dihasilkannya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus* spp. dan telah digunakan dalam pengobatan infeksi akibat serangan dari bakteri patogen *Staphylococcus*. Agen antimikroba tersebut bersifat non-sitotoksik dan dapat dioptimalkan lebih lanjut untuk aplikasi dalam bioteknologi (Ye et al., 2023). Kemudian, studi terbaru juga menyoroti potensi *Bacillus nitratireducens* dalam meningkatkan produktivitas tanah. Bakteri ini menghasilkan Indole-3-Acetic Acid (IAA), siderofor, dan ACC deaminase, yang berkontribusi terhadap peningkatan kesuburan tanah (Susilowati et al., 2024). Selain itu, *Bacillus nitratireducens* telah dieksplorasi untuk aplikasinya dalam industri pertambangan dan pengelolaan limbah, yang mendorong praktik berkelanjutan dan ramah lingkungan (Rus et al. 2024).

Strain bakteri ketiga yang teridentifikasi dalam penelitian ini adalah *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 TRS3. Bakteri ini juga menunjukkan potensi dalam memproduksi bakteriosin, sebagaimana ditunjukkan oleh kemampuan bakteriosin kasarnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri indikator (Tabel 2.4). Hal ini sejalan dengan bukti pendukung dari kemampuan *Bacillus*, dilaporkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan bersifat termostabil dan mampu mempertahankan stabilitasnya pada berbagai rentang pH, dan cocok untuk aplikasi dalam industri pangan maupun lingkungan (Vilpišauskaitė, 2023; Adetiloye et al., 2025). Laporan

hasil penelitian lainnya dari kemampuan *Bacillus paramycoides* menghasilkan senyawa bioaktif dengan memiliki sifat antifungi yang signifikan (El Mohammady et al., 2024), selain itu juga dilaporkan bahwa senyawa bioaktifnya memiliki aktivitas antimikroba kuat terhadap *Escherichia coli* dan *Mucor* sp. (Hossain et al., 2024). Selanjutnya, senyawa bioaktif yang diproduksi *Bacillus paramycoides* menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,65 mM untuk DPPH, sekaligus memperlihatkan sifat antimikroba (Aziz et al. 2024). Strain *Bacillus paramycoides* yang diisolasi dari fermentasi singkong (tape) juga terbukti mampu menghasilkan antibiotik (Muhiddin et al., 2024). Lebih jauh lagi, *Bacillus paramycoides* mampu mensintesis nanopartikel seng oksida (ZnONPs) yang memiliki sifat antioksidan, antimikroba, dan antikanker. ZnONPs tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan dan antibakteri terhadap berbagai patogen, serta efek sitotoksik dan apoptosis terhadap sel kanker hati (HepG2) dan sel kanker payudara (MCF-7) (El-Refai et al. 2024).

2.5 Kesimpulan

Simpulan dari penelitian ini yaitu tiga bakteri potensial penghasil bakteriosin yang diisolasi dari terasi udang rebon (*Acetes*) telah diidentifikasi. Sampel TRS1 teridentifikasi sebagai *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406, TRS2 sebagai *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732, dan TRS3 sebagai *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098. Di antara ketiga isolat tersebut, bakteriosin kasar yang dihasilkan dari *Bacillus tropicus* strain MCCC 1A01406 (TRS1) menunjukkan potensi antimikroba tertinggi, disusul oleh *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098 (TRS3), sedangkan *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 (TRS2) memperlihatkan aktivitas penghambatan terendah.

Berdasarkan hasil uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), seluruh sampel bakteriosin yang diuji menunjukkan aktivitas antimikroba yang ditandai dengan terbentuknya zona bening (zona halo) sebagai indikator kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri pembusuk pada udang. Pada konsentrasi terendah dengan daya hambat minimum tertinggi, bakteriosin TRS1 menghasilkan zona halo sebesar 2,3 mm pada konsentrasi 0,19%, diikuti oleh bakteriosin TRS3 dengan zona halo sebesar 2,3 mm pada konsentrasi 0,39%, dan bakteriosin TRS2 dengan zona halo sebesar 1,2 mm pada konsentrasi 0,78%. Nilai MIC masing-masing bakteriosin ditetapkan sebesar 1 µL/mL untuk TRS1, 3 µL/mL untuk TRS3, dan 7 µL/mL untuk TRS2, yang seluruhnya ditentukan berdasarkan kemunculan zona halo sebagai bukti penghambatan efektif. Hasil ini menunjukkan bahwa seluruh bakteriosin memiliki aktivitas antimikroba, namun bakteriosin TRS1 menunjukkan potensi paling tinggi karena mampu menghasilkan zona halo terbesar pada konsentrasi terendah, sehingga paling efisien dan paling menjanjikan untuk dikembangkan sebagai pengawet alami yang memenuhi kriteria efektivitas dan kesesuaian dengan standar internasional.

Temuan ini memberikan dasar bagi penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi optimasi produksi bakteriosin, metode pemurnian, serta potensi

aplikasinya dalam pengawetan pangan maupun terapi medis. Studi mendatang juga dapat meneliti mekanisme genetik yang mendasari sintesis bakteriosin pada strain bakteri ini untuk meningkatkan penerapan pada skala industri.

2.6 Daftar Pustaka

- Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, S., Ariff, A.B., 2017. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances* 7 (47): 29395-29420. <https://doi.org/10.1039/C6RA24579J>.
- Adetiloye, O.A., Solomon, B.O., Omolaiye, J.A., 2025. Optimization of thermostable amylolytic enzyme production from *Bacillus cereus* isolated from a recreational warm spring via Box Behnken design and response surface methodology. *Microbial Cell Factories* 24 (87). <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02709-w>.
- Apriyanto, H., Harpeni, E. and Setyawan, A., 2014. Utilization of *Rhizophora* sp. fruit extract as an antibacterial agent against freshwater fish pathogenic bacteria. *E-J. Rekayasa Teknol. Budidaya Perairan* 3 (1): 289–296.
- Aziz, M.I., Hasan, M.M., Ullah, R., Bari, A., Khan, M.A., Ul Hasnain, S.Z., Baloch, R., Akram, M., Obaid, A., Ullah, A., Abbas, K. and Amin, A., 2024. Potential role of Citrus bergamia flower essential oil against oral pathogens. *BMC Complement. Med. Ther.* 24 (1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04457-7>.
- Bahrami, S., Andishmand, H., Pilevar, Z., Hashempour-Baltork, F., Torbati, M., Dadgarnejad, M., Rastegar, H., Mohammadi, S.A. and Azadmard-Damirchi, S., 2024. Innovative perspectives on bacteriocins: advances in classification, synthesis, mode of action, and food industry applications. *J. Appl. Microbiol.* 135 (11): lxae274. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae274>.
- Barbosa, A.A.T., de Melo, M.R., da Silva, C.M.R., Jain, S. and Dolabella, S.S., 2021. Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. *Crit. Rev. Microbiol.* 47 (3): 376–385. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1893264>.
- Besson, S., Almeida, M.G. and Silveira, C.M., 2022. Nitrite reduction in bacteria: a comprehensive view of nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* 464: 214560. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214560>.

- Brzoska, A.J. and Hassan, K.A., 2014. Quantitative PCR for detection of mRNA and gDNA in environmental isolates. *Methods Mol. Biol.* 1096: 25–42. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-712-9_3.
- Cheruvuri, A. and Kammara, R., 2024. Bacteriocins future perspectives: substitutes to antibiotics. *Food Control* 168: 110834. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110834>.
- Darbandi, A., Asadi, A., Ari, M.M., Ohadi, E., Talebi, M., Zadeh, M.H., Emamie, A.D., Ghanavati, R. and Kakanj, M., 2022. Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *J. Clin. Lab. Anal.* 36 (1): e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1007/BF00399424>.
- Du, H., Li, S., Yao, H., Wang, N., Zhao, R. and Meng, F., 2024. Bacteriocin mining in *Lactiplantibacillus pentosus* PCZ4 with broad-spectrum antibacterial activity and its biopreservative effects on snakehead fish. *Foods* 13 (23): 3863. <https://doi.org/10.3390/foods13233863>.
- Duhan, P., Bansal, P. and Rani, S., 2020. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from medicinal plant *Tinospora cordifolia*. *S. Afr. J. Bot.* 134: 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.047>.
- El Mohammady, E.M., El-Rahim, A., Mohamed, W., Gohar, M.R., Abd El Aleem, M. and Elsayed, T.R., 2024. Applying wheat-associated bacteria producing volatile organic compounds (VOCs) antagonistic to plant pathogenic fungi. *Egypt. J. Chem.* 67 (13): 1103–1115. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.325246.10557>.
- Elidrissi, A., Ezzaky, Y., Boussif, K. and Achemchem, F., 2023. Isolation and characterization of bioprotective lactic acid bacteria from Moroccan fish and seafood. *Braz. J. Microbiol.* 54 (3): 2117–2127. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01077-0>.
- El-Refai, H.A., Saleh, A.M., Mohamed, S.I.A., Aboul Naser, A.F., Zaki, R.A., Gomaa, S.K. and Hamed, M.A., 2024. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Bacillus paramycoides* for in vitro biological activities and in vivo assessment against hepatorenal injury induced by CCl₄ in rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 196 (9): 5953–5973. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04817-y>.

- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. and Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120 (1–2): 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>.
- Gonzalez, J.M. and Aranda, B., 2023. Microbial growth under limiting conditions – future perspectives. *Microorganisms* 11 (7): 1641. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071641>.
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H. and Peschel, A., 2021. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (11): 726–739. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>.
- Helmi, H., Astuti, D.I., Aditiawati, P., 2024. Bacterial diversity and community level physiological profiling of terasi (Indonesian shrimp paste) to ensure its food safety. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1302 (1): 012096. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1302/1/012096>.
- Herlina, V.T., Setiarto, R.H.B., 2024. Terasi, exploring the Indonesian ethnic fermented shrimp paste. *Journal of Ethnic Foods* 11 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s42779-024-00222-w>.
- Hoover, D.G. and Steenson, L.R., 2014. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hossain, K.M., Khan, U., Rahman, S.M. and Khan, M.S., 2024. Potential antimicrobial and fruit juice clarification activity of amylase enzyme from *Bacillus* strains. *Biotechnol. Rep.* 44: e00861. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00861>.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control* 22 (3–4): 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.010>.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45 (9): 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07>.

- Jiang, Y.-H., Xin, W.-G., Zhang, Q.-L., Lin, L.-B. and Deng, X.-Y., 2022. A novel bacteriocin against *Shigella flexneri* from *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from tilapia intestine: purification, antibacterial properties and antibiofilm activity. *Front. Microbiol.* 12: 779315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.779315>.
- Kanauchi, M., 2019. Lactic Acid Bacteria. *Methods in Molecular Biology* 1887.
- Karnwal, A. and Malik, T., 2024. Exploring the untapped potential of naturally occurring antimicrobial compounds: novel advancements in food preservation for enhanced safety and sustainability. *Front. Sustain. Food Syst.* 8: 1307210. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1307210>.
- Khan, H., Flint, S.H. and Yu, P.-L., 2014. Bacteriocins: the natural food preservatives. In: Rai, V.R. and Bai, J.A. (eds). *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*. CRC Press, Boca Raton.
- Kim, D.-H. and Austin, B., 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (3): 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02401.x>.
- Kobayashi, T., Agustini, T.W., Ibrahim, R., Kamei, K., Kondo, A., Kajiwarra, M., Imada, C., 2016. Production of bacteriocin by *Virgibacillus salexigens* isolated from “terasi”: a traditionally fermented shrimp paste in Indonesia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (3): 47. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1991-2>.
- Kowalska-Krochmal, B. and Dudek-Wicher, R., 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens* 10 (2): 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Sarkar, T., Pati, S., Basu, D. et al., 2022. Bacteriocin: a natural approach for food safety and food security. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10: 1005918. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918>.
- Li, W., Lu, H., He, Z., Sang, Y. and Sun, J., 2021. Quality characteristics and bacterial community of a Chinese salt-fermented shrimp paste. *LWT* 136: 110358. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110358>.
- Li, Y., Ma, H., Pan, R., Long, Y., Zhao, Y., Yu, M., Peng, J. and Ma, Y., 2025. Optimisation of cultivation conditions for *Bacillus velezensis* G7 from mangrove plants and exploration of potential bacteriocins. *Front. Pharmacol.* 16: 1530043. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1530043>.

- Lim, E.-S., 2022. Influence of bacteriocin-producing *Bacillus* strains on quality characteristics of fermented soybean product with biogenic amine-forming lactic acid bacteria. *Appl. Biol. Chem.* 65: 5. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00664-9>.
- Ma, H., Ding, Y., Peng, J., Li, Y., Pan, R., Long, Y., Zhao, Y., Guo, R. and Ma, Y., 2025. Identification and characterization of a novel bacteriocin PCM7-4 and its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *Microbiol. Res.* 290: 127980. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127980>.
- Marchesi, J.R., Takuichi, S., Andrew, J.W., Tracey, A.M., John, C.F., Sarah, J.H. and William, G.W., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795–799.
- Muhiddin, N.H., Herawati, N., Ramlawati, R. and Hidayah, N., 2024. Characterization of antibiotic-producing bacteria from cassava tape fermented by traditional ragi tape. *Biodiversitas* 25 (9): 3359–3368. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d250958>.
- Naghavi, M., Vollset, S.E., Ikuta, K.S. et al., 2024. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet* 404 (10459): 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1).
- Ooi, M.F., Mazian, N., Foo, H.L., Loh, T.C., Mohamad, R., Rahim, R.A. and Ariff, A., 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malays. J. Microbiol.* 11 (2): 176–184. <https://doi.org/10.21161/mjm.13014>.
- Pato, U., Riftyan, E., Jonnaidi, N.N., Wahyuni, M.S., Feruni, J.A. and Abdel-Wahhab, M.A., 2022. Isolation, characterization, and antimicrobial evaluation of bacteriocin produced by lactic acid bacteria against *Erwinia carotovora*. *F. Sci. Technol.* 42: e11922. <https://doi.org/10.1590/fst.11922>.
- Perez, R.H., Zendo, T. and Sonomoto, K., 2022. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 134 (4): 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.07.007>.
- Pramono, H., Suciati, P., Putra, T.F., Andika, N. and Utari, S., 2023. Reduction of pathogenic bacteria during fermentation of masin by protease- and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Aquasains* 7 (1): 629–636. <https://doi.org/10.23960/aqs.v7i1.p629-636>.

- Ren, W., Li, P., Wang, X., Che, Y., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Zeng, Y. and Xie, Z., 2022. Cross-habitat distribution pattern of *Bacillus* communities and their capacities of producing industrial hydrolytic enzymes in Paracel Islands: habitat-dependent differential contributions of the environment. *J. Environ. Manag.* 323: 116252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116252>.
- Rus, A.M.M., Winarko, R., Chaerun, S.K., Mufakhir, F.R., Astuti, W. and Minwal, W.P., 2024. Bioleaching of rare earth elements (REEs) from Indonesian red mud by the bacterium *Bacillus nitratireducens* strain SKC/L-2. *E3S Web Conf.* 543: 02014. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202454302014>.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sardar, D., Afsana, S., Habib, A. and Hossain, T., 2025. Dietary effects of multi-strain probiotics as an alternative to antibiotics on growth performance, carcass characteristics, blood profiling and meat quality of broilers. *Vet. Integr. Sci.* 23 (2): 1–17. <https://doi.org/10.12982/VIS.2025.059>.
- Sharma, N., Kapoor, R.T., Gautam, N. and Kumari, R., 2011. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* R75 isolated from fermented chunks of mung bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2): 1330–1340.
- Shu, H., He, X., Hong, Z., Dong, K., Zou, Y., Cao, M., Wang, R., Xu, Y., Liao, L., Zuo, H. and Pei, X., 2024. Screening and genome analysis of potential probiotic lactic acid bacteria with broad-spectrum antibacterial activity from Sichuan sun-dried vinegar grains (Cupei). *LWT* 202: 116288. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116288>.
- Sugrue, I., Ross, R.P. and Hill, C., 2024. Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nat. Rev. Microbiol.* 22: 556–571. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01045-x>.
- Susilowati, D.N., Widawati, S., Suliasih, S., Syah, M.F., Radiastuti, N., Sofiana, I. and Anda, M., 2024. Characteristics and potency of culturable bacteria from tidal and non-tidal swamps in South Kalimantan and South Sumatra, Indonesia. *AIP Conf. Proc.* 2970: 050015. <https://doi.org/10.1063/5.0208354>.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.

- Taylor, T.M., Davidson, P.M. and Zhong, Q., 2007. Extraction of nisin from a 2.5% commercial nisin product using methanol and ethanol solutions. *J. Food Prot.* 70 (5): 1272–1276. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1272>.
- Vilpišauskaitė, A., 2023. Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria (Doctoral dissertation, Vilniaus universitetas).
- Wess, L., 2023. *The Curious World of Bacteria*. Greystone Books Ltd, Canada.
- Wu, Y., Tie, Y., Tang, Z., Zhu, H., Li, Y., Zhu, W., Wang, X. and Yin, L., 2025. Isolation and identification of functional *Bacillus* strain from Cupei of Sichuan bran vinegar and evaluation of its fermentation characteristics. *Shipin Gongye Keji* 46 (2): 122–131. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010069>.
- Ye, J., Fugaban, J.I.I., Dioso, C.M., Bucheli, J.E.V., Choi, G.-H., Kim, B., Holzapfel, W.H. and Todorov, S.D., 2023. *Bacillus* strains isolated from Korean fermented food products with antimicrobial activity against Staphylococci, an alternative for control of antibiotic-resistant pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* 20 (7): 279–293. <https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0019>.
- Zhang, X., Xin, N., Zhu, Z., Li, X., Dai, D., Pan, C., Peng, D. and Sun, M., 2022. Three novel leaderless bacteriocins have antimicrobial activity against Gram-positive bacteria to serve as promising food biopreservatives. *Microb. Cell Fact.* 21 (1): 194. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01912-3>.