

**Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Nira Aren [(*Arenga pinnata* (Wurmb))] Asal Papua Sebagai Kandidat Probiotik
(Selection of Lactic Acid Bacteria from Palm Sap [(*Arenga pinnata* (Wurmb))] Origin Papua as Probiotic Candidate)**

Sulistiani¹, Achmad Dinoto¹, Heddy Julistiono¹, Rini Handayani¹, Anna P. Roswiem², Pipit Novita Sari² & Sugiyono Saputra¹

¹Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Jalan Raya Bogor km 46, Cibinong 16911

²Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi - STTIF Bogor

Email: sulis_lipi@yahoo.com

Memasukkan: Agustus 2019, **Diterima:** Februari 2020

ABSTRACT

Palm sap has several nutrients which are suitable to support the growth of lactic acid bacteria (LAB). As a probiotic, LAB have been intensively studied to promote gastrointestinal health in humans and animals. This study aimed to assess the probiotic properties of LAB isolated from [(*Arenga pinnata* (Wurmb))] palm sap originated from Papua. Several probiotic property tests were performed, including antimicrobial activity against *Escherichia coli* InaCC B5 and *Bacillus cereus* InaCC B9, resistance to bile salts (0.1%, 0.2%, 0.3%), to low pH (pH 2.5), simulated gastric juice (SGJ) and simulated intestinal juice (SIJ). Further antimicrobial activity was conducted against 12 pathogenic bacteria, followed by characterisation of enzymatic properties, genetic profiles (RAPD-PCR M13 and ERIC-PCR) and molecular identification based on 16S rDNA sequences. The results show that 6 out of 52 isolates obtained from palm sap originated Papua were fulfilled the criteria as probiotic candidates, including able to produce antimicrobial activity (inhibiting 12 pathogenic bacteria) and able to survive when exposed in low pH, bile salt, simulated gastric juice and simulated intestinal juice. Further biochemical tests indicate that isolates NP29 and NP34 produce protease and amylase enzymes while isolates NP29, NP33, NP44, NP46, NP57 produce phytase enzymes. Genetic profiling and molecular identification confirm that all isolates classified into three groups, including group 1 (NP29, NP33, NP46, NP57) identified as *Lactobacillus plantarum*, group 2 (NP34) identified as *Lactobacillus casei* and group 3 (NP44) identified as *Lactobacillus paracasei*.

Keywords: Lactic acid bacteria, palm sap, Papua, probiotic.

ABSTRAK

Nira Aren yang kaya nutrisi mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL). BAL sebagai probiotik telah menjadi fokus penelitian secara intensif karena berperan untuk kesehatan pada manusia dan hewan. Penelitian ini bertujuan mendapatkan BAL kandidat probiotik dari nira Aren [(*Arenga pinnata* (Wurmb))] asal Papua. Beberapa tahap analisis yang dilakukan meliputi uji antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* InaCC B5 dan *Bacillus cereus* InaCC B9, uji ketahanan terhadap garam empedu (0,1%, 0,2%, 0,3%), ketahanan terhadap pH rendah (pH 2,5), ketahanan terhadap paparan *Simulated gastric juice* (SGJ) dan *Simulated intestinal juice* (SIJ). Karakterisasi lebih lanjut, dilakukan uji antimikroba terhadap 12 bakteri patogen, uji aktivitas enzim, analisis profil genetik (RAPD-PCR M13 dan ERIC-PCR) dan identifikasi molekuler berdasarkan sekuen 16S rDNA. Sebanyak 52 isolat BAL berhasil diperoleh dan 6 isolat diantaranya memenuhi kriteria sebagai kandidat probiotik (memiliki aktivitas antimikroba, tahan terhadap pH rendah, garam empedu, *simulated gastric juice* (SGJ) dan *simulated intestinal juice* (SIJ)). Karakterisasi lebih lanjut menunjukkan 6 isolat tersebut mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, mampu menghambat 12 bakteri patogen, memiliki aktivitas enzim protease dan amilase (NP29 dan NP34) dan enzim fitase (NP29, NP33, NP44, NP46, NP57). Profil genetik dan identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat terbagi menjadi 3 grup, meliputi grup 1 (NP29, NP33, NP46, NP57) teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, grup 2 (NP34) teridentifikasi sebagai *Lactobacillus casei* dan grup 3 (NP44) teridentifikasi sebagai *Lactobacillus paracasei*.

Kata Kunci: Bakteri asam laktat, nira aren, Papua, probiotik.

PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai suplemen makanan berupa mikroba hidup yang menguntungkan

inang dengan meningkatkan keseimbangan mikrobiota usus (Fuller 1989). Meningkatnya kesadaran akan kesehatan telah mendorong perkembangan makanan fungsional yang mengandung probiotik.

Bukti ilmiah menunjukkan berbagai efek probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan termasuk terhadap gangguan patogen, imunostimulasi dan imunomodulasi, anti karsinogenik dan antimutagenik, pengurangan gejala intoleransi laktosa, penurunan kolesterol serum, penurunan tekanan darah, penurunan kejadian dan durasi diare, pencegahan vaginitis dan pemeliharaan integritas mukosa. Konsep probiotik juga banyak diterapkan untuk meningkatkan kesehatan pada hewan ternak, hewan peliharaan dan hewan air (Buntin *et al.* 2008).

Probiotik sangat direkomendasikan sebagai alternatif pengganti antibiotik dalam pakan hewan. Banyak antibiotik telah digunakan dalam pakan dalam rangka meningkatkan konversi makanan (*feed conversion*) dan mencegah penyakit saluran pencernaan oleh bakteri. Pemberian antibiotik pada pakan hewan menghasilkan efek yang kurang baik seperti penumpukan antibiotik pada jaringan hewan, ketidakseimbangan dalam flora usus normal, berkurangnya populasi mikroba usus yang bermanfaat, dan memunculkan resistensi antibiotik pada bakteri (Kim *et al.* 2007).

Banyak bakteri asam laktat (BAL) terbukti berfungsi sebagai probiotik, yang bermanfaat bagi kesehatan inang (Buntin *et al.* 2008). BAL diketahui telah beradaptasi dan tumbuh di bawah kondisi lingkungan yang sangat beragam dan tersebar luas di alam (Valder & Noralabetu 2018). Nira Aren yang kaya nutrisi adalah sumber media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Karena nira Aren kaya akan gula, mikroorganisme menggunakan gula dalam nira sebagai sumber energi dan menghasilkan fermentasi (Naknean *et al.* 2010). Tujuan dari penelitian ini adalah isolasi dan pemilihan BAL dari nira *Arenga pinnata* (Wurmb). asal Papua untuk kandidat probiotik, untuk menambah informasi mengenai potensi nira sebagai sumber eksplorasi probiotik dan diperolehnya BAL kandidat probiotik.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel nira Aren (*Arenga pinnata* Merr.) berasal dari Papua. Nira Aren diperoleh setelah 12 jam penyadapan kemudian nira dimasukkan dalam botol steril dan disimpan di temperatur dingin (4°C) di *ice box* selama transportasi ke laboratorium Pusat Penelitian Biologi (Cibinong, Bogor), LIPI.

Proses isolasi BAL dari nira dilakukan dengan metode pengenceran serial dengan cara nira divortek terlebih dahulu dan diambil sebanyak 1 mL kemudian diencerkan secara serial. Sebanyak 0,1 mL diinokulasikan ke media *deMan, Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA)+CaCO₃ 0,5% diinkubasi secara anaerobik pada temperatur 37°C selama 4

hari. Isolat yang tumbuh dihitung, BAL dimurnikan dan dianalisis lebih lanjut. Selain itu nira juga diukur pHnya.

Bakteri indikator/patogen digunakan *E. coli* InaCC B5 sebagai perwakilan bakteri gram negatif dan *B. cereus* InaCC B9 perwakilan bakteri gram positif. Uji antimikroba dilakukan dengan menambahkan bakteri patogen 7 µL umur 24 jam ke dalam 100 mL media Mueller Hinton (MH) mengandung Agar 0,75%, konsentrasi bakteri patogen berkisar 10⁶ cfu/mL. Campuran media MH 0,75% Agar dan bakteri dipipet sebanyak 5 mL dituang di atas 20 mL media MH 1,8% Agar di cawan petri, media dibiarkan mengeras/beku. Media diberi kode isolat BAL dan dilubangi menggunakan sedotan steril berdiameter 5 mm. BAL yang telah ditumbuhkan di MRS *broth* (37°C, 24 jam) sebanyak 50 µL diinokulasikan ke lubang/sumuran diinkubasi 37°C selama 48 jam dan selanjutnya diukur zona hambatnya. Pengujian dilakukan secara duplo dan sedikit modifikasi (Al-Allaf *et al.* 2009; Tagg & McGiven 1971).

Isolat BAL masing-masing sebanyak 5 µL diinokulasikan pada MRSA yang mengandung *oxgall* dengan konsentrasi 0,1%, 0,2%, 0,3% (masing-masing uji dilakukan duplo). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. Setelah 2 hari diamati pertumbuhannya (Buntin *et al.* 2007; Tokatli *et al.* 2015).

Isolat BAL yang tahan terhadap garam empedu ditumbuhkan pada 0,5 mL MRS *broth* dibuat duplo, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian isolat disentrifugasi 5400 rpm selama 15 menit dan supernatan dibuang. Sel dicuci dengan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) steril. Komposisi PBS: NaCl (9 g/L), Na₂HPO₄.2H₂O (9 g/L) dan KH₂PO₄ (1,5 g/L) pH 7,4 sebanyak 1 mL, suspensi sel disentrifugasi kembali 5400 rpm selama 5 menit. Setelah sel dicuci, ditambahkan PBS pH 2,5 sebanyak 1 mL, divortek dan diinkuasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Pada jam ke-0 dan jam ke-4 suspensi sel sebanyak 10 µL ditumbuhkan pada MRS Agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Tokatli *et al.* 2015).

Media uji *Simulated Gastric Juice* (SGJ) dibuat dengan komposisi pepsin (3 mg/mL) dilarutkan dalam 100 mL NaCl 0,85% pH 2,5 yang telah disterilkan. Media uji SGJ sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung steril. Selanjutnya masing-masing isolat BAL sebanyak 50 µL (1%) dimasukkan ke SGJ, divortek dan diinkubasi 37°C selama 4 jam. Pada 0 jam dan 4 jam, suspensi sel diencerkan serial (10⁻² sampai 10⁻⁵), diambil 0,1 mL ditumbuhkan pada media GYPA, diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh dihitung

(Tokatli *et al.* 2015). Komposisi media GYPA: glukosa (10 g/L), *yeast extract* (5 g/L), pepton (5 g/L), tween 80 (0,5 mL/L), *salt solution* 5 mL/L, CaCO₃ (0,5%), Agar (1,8%), dan akuades 1 L (Okada *et al.* 1986).

Media uji *Simulated Intestinal Juice* (SIJ) dibuat dengan komposisi *oxgall* 0,3%, pankreatin (1 mg/mL) dilarutkan dalam 100 mL NaCl 0,85% pH 8 steril. Media uji SIJ sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung ditambah masing-masing isolat BAL 50 µL (1%) divortek dan diinkubasi 37°C selama 6 jam. Pada 0 Jam dan 6 jam, suspensi sel diencerkan serial (10⁻² sampai 10⁻³), diambil 0,1 mL ditumbuhkan pada media GYPA, diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh dihitung (Tokatli *et al.* 2015).

Bakteri asam laktat yang telah diinkubasi selama 24 jam 37°C dipipet sebanyak 5 µL diteteskan ke 20 mL media GYP 1,8% Agar dalam cawan petri steril. Sel dibiarkan mengering kemudian sel ditutup dengan MH 0,7% Agar. Petri diinkubasi selama 24 jam 37°C. Bakteri indikator/ patogen ditumbuhkan 24 jam 37°C dalam BHI *broth* kemudian dimasukkan ke dalam MH 0,7% Agar dengan persentasi bakteri sebagai berikut: *Edwardsiella ictaluri* 5%, *Escherichia coli* InaCC B5 5%, *Aeromonas sobria* 5%, *Salmonella enterica* JCM 1652 5%, *Lysteria monocytogenes* JCM 7671 5%, *Staphylococcus aureus* InaCC B4 5%, *Plesiomonas shigelloides* 5%, *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B3 2%, *Klebsiella pneumonia* 2%, dan *Bacillus cereus* InaCC B9 2%. Media BHI 0,7% Agar digunakan untuk uji bakteri *Streptococcus agalactiae* 5% dan *Aeromonas hydrophilla* 5%. Media MH 0,7% Agar atau BHI 0,7% Agar dan bakteri patogen sebanyak 5 mL dituang di atas media yang berisi BAL kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Pengujian dengan modifikasi dilakukan secara duplo. Kontrol positif digunakan antibiotik Tetrasiklin 30 µg dan Gentamisin 10 µg. Diameter koloni dan zona hambat diukur, hasil rerata dimasukkan dalam tabel (Oluwajoba *et al.* 2013).

Isolat BAL diuji aktivitas enzimnya (amilase, protease, dan fitase). BAL ditumbuhkan 24 jam 37°C kemudian diinokulasi ke media yang relevan dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, zona bening yang mengelilingi masing-masing koloni diukur dan dihitung indek enzimnya. Indek enzim ditentukan dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Pengujian aktivitas enzim dilakukan secara duplo (Taheri *et al.* 2009; Kim *et al.* 2007).

Untuk melakukan pengujian kurva pertumbuhan BAL dilakukan dengan cara sebanyak

1 mL BAL dimasukkan ke dalam 100 mL media GYP *broth* steril kemudian divortek hingga homogen. Selanjutnya BAL diukur pertumbuhannya setiap 2 jam dengan mengukur *optical density*nya (OD) suspensi sel BAL selama 26 jam/ masuk fase stasioner menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm. Pengukuran kurva pertumbuhan BAL digunakan media GYP *broth* karena warna dari media tersebut lebih terang dibandingkan MRS *broth* sehingga lebih mendukung untuk pengambilan OD.

Amplifikasi RAPD-PCR menggunakan primer tunggal M13 dilakukan berdasarkan metode Rossetti & Giraffa (2005). Volume masing-masing reaksi sebanyak 42 mL. Komposisi reaksi RAPD-PCR terdiri atas 22,5 mL GoTagO Green master mix 2x, 9 mL primer M13 10 mM, 10,5 mL NFW dan 1 mL DNA *template* (10-100 ng). Reaksi RAPD-PCR dilakukan dengan predenaturasi (94°C 2 menit), 40 siklus (94°C selama 1 menit, 42°C 20 detik, 72°C 2 menit), ekstensi (72°C 10 menit) dan pendinginan (4°C 20 menit) (Rossetti & Giraffa 2005).

Amplifikasi ERIC-PCR dilakukan berdasarkan metode Gilling dan Holley (1997) menggunakan primer tunggal ERIC2. Komposisi reaksi ERIC-PCR terdiri atas: 22,5 mL GoTagO Green master mix 2x, 9 mL primer ERIC2 10 mM, 10,5 mL NFW dan 1 mL DNA *template* (10-100 ng). Reaksi ERIC-PCR dilakukan dengan predenaturasi (94°C 3 menit), 35 siklus (94°C 30 detik, 46°C 1,5 menit dan 68°C 8 menit), ekstensi (68°C 8 menit) dan pendinginan (4°C 20 menit) (Gilling & Holley 1997).

Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2% (b/v) panjang 6 cm pada 100 V selama 1 jam. Volume produk PCR yang digunakan dalam elektroforesis sebanyak 15 mL dan volume DNA *ladder* sebanyak 7,5 mL. Gel direndam dalam larutan ethidium bromida 10 mg/mL selama 30 menit kemudian dicuci dengan TAE 1X dan didokumentasi menggunakan *gel documentation system*. DNA *ladder* 0,5Kb digunakan dalam elektroforesis untuk mengetahui ukuran pita DNA hasil amplifikasi (Rossetti & Giraffa 2005).

Berdasarkan Data 16S rDNA. Amplifikasi PCR 16S rDNA dilakukan dengan metode *colony* PCR. Komposisi reaksi PCR sebesar 30 mL terdiri atas: 15 mL GoTagO Green master mix 2x, 2,4 mL primer 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') 10 mM dan 2,4 mL primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 10 mM, 9,2 mL NFW dan 1 mL (10-100 ng) DNA *template* (Nikolova *et al.* 2009). Reaksi PCR sebagai berikut 94°C 90 detik, 30 siklus (95°C 30 detik, 50°C 30 detik, 72°C 90 detik), ekstensi 72°C 5 menit dan pendinginan (4°C 20 menit) (Promega 2012). Semua produk PCR 16S rDNA disekuensing menggunakan primer 27F dan 1492R. Hasil sekuen DNA diedit dan digabungkan menggunakan program BioEdit (Hall 1999). Hasil

penggabungan sekuen DNA di *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ke *GenBank* NCBI. Analisis filogenetik menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versi 5.2 dengan *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (Tamura *et al.* 2011). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *neighbor joining* (NJ). Kekuatan pohon filogenetik diuji menggunakan metode *bootstrap* (Efron 1979) dengan 1000 kali ulangan.

HASIL

Jumlah BAL dalam nira Aren Papua $1,65 \times 10^7$ cfu/mL. Hasil isolasi diperoleh 52

isolat BAL. Hasil pengukuran derajat keasaman menunjukkan pH nira 4,0. Hasil uji antimikroba BAL terhadap *B. cereus* InaCC B9, daya hambatnya berkisar 0-13 mm dan terhadap *E. coli* InaCC B5 berkisar 7,75-12,75 mm, ditampilkan dalam Tabel 1.

Hasil uji ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu (*oxgall*) yang dengan lama perlakuan 2 - 4 hari menunjukkan semua isolat tahan terhadap *oxgall* 0,1% dan 0,2% dan 6 isolat (NP29, NP33, NP34, NP44, NP46, dan NP57) yang tahan terhadap *oxgal* 0,3%, Tabel 2.

Isolat yang tahan terhadap *oxgall* 0,3% diuji ketahanannya terhadap pH rendah. Hasil menunjukkan keenam isolat (NP29, NP33, NP34, NP44, NP46, dan NP57) tahan terhadap pH 2,5.

Tabel 1. Hasil rata - rata uji antimikroba BAL terhadap *B. cereus* InaCC B9 dan *E. coli* InaCC B5.

No.	Kode isolat	Diameter zona hambat (mm)		No.	Kode isolat	Diameter zona hambat (mm)		No.	Kode isolat	Diameter zona hambat (mm)	
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>			<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>			<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
1	NP1	12,00	11,75	19	NP29	11,25	11,75	37	NP48	11,25	11,50
2	NP2	12,00	10,25	20	NP30	11,00	10,75	38	NP49	11,75	11,00
3	NP5	11,25	11,75	21	NP31	12,50	11,37	39	NP50	11,50	11,00
4	NP6	11,00	12,25	22	NP32	10,50	11,50	40	NP51	11,25	10,37
5	NP10	11,00	12,00	23	NP33	11,00	11,00	41	NP52	10,75	11,00
6	NP11	12,00	12,75	24	NP34	10,00	11,00	42	NP53	10,25	11,00
7	NP13	0,00	9,25	25	NP35	12,00	11,75	43	NP54	9,50	10,00
8	NP14	10,50	12,75	26	NP36	11,75	11,37	44	NP55	9,75	10,75
9	NP15	12,00	12,25	27	NP37	13,00	11,25	45	NP57	10,00	11,00
10	NP16	11,00	12,12	28	NP38	13,00	11,50	46	NP58	10,75	10,50
11	NP17	11,00	12,50	29	NP39	12,00	11,00	47	NP60	8,00	10,50
12	NP18	11,50	11,75	30	NP40	12,75	9,62	48	NP64	10,75	9,50
13	NP19	10,25	10,50	31	NP41	11,00	11,00	49	NP66	11,75	9,37
14	NP20	10,25	11,25	32	NP42	7,00	9,25	50	NP67	8,00	7,75
15	NP25	10,75	11,00	33	NP43	9,00	9,75	51	NP73	12,00	9,50
16	NP26	11,25	10,75	34	NP44	11,75	12,00	52	NP74	8,75	9,75
17	NP27	11,25	10,25	35	NP45	11,50	11,00				
18	NP28	11,25	11,50	36	NP46	11,75	11,00				

Tabel 2. Hasil uji ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu (*oxgall*).

Konsentrasi <i>Oxgall</i> (%)	0,1						0,2						0,3										
	2		4		2		4		2		4		2		4		2		4				
	Perlakuan (hari)						Perlakuan (hari)						Perlakuan (hari)										
1	NP1	+	+	+	+	-	-	19	NP29	+	+	+	+	+	+	37	NP48	+	+	+	+	-	-
2	NP2	+	+	+	+	-	-	20	NP30	+	+	+	+	-	-	38	NP49	+	+	+	+	-	-
3	NP5	+	+	+	+	-	-	21	NP31	+	+	+	+	-	-	39	NP50	+	+	+	+	-	-
4	NP6	+	+	+	+	-	-	22	NP32	+	+	+	+	-	-	40	NP51	+	+	+	+	-	-
5	NP10	+	+	+	+	-	-	23	NP33	+	+	+	+	+	+	41	NP52	+	+	+	+	-	-
6	NP11	+	+	+	+	-	-	24	NP34	+	+	+	+	+	+	42	NP53	+	+	+	+	-	-
7	NP13	+	+	+	+	-	-	25	NP35	+	+	+	+	-	-	43	NP54	+	+	+	+	-	-
8	NP14	+	+	+	+	-	-	26	NP36	+	+	+	+	-	-	44	NP55	+	+	+	+	-	-
9	NP15	+	+	+	+	-	-	27	NP37	+	+	+	+	-	-	45	NP57	+	+	+	+	+	+
10	NP16	+	+	+	+	-	-	28	NP38	+	+	+	+	-	-	46	NP58	+	+	+	+	-	-
11	NP17	+	+	+	+	-	-	29	NP39	+	+	+	+	-	-	47	NP60	+	+	+	+	-	-
12	NP18	+	+	+	+	-	-	30	NP40	+	+	+	+	-	-	48	NP64	+	+	+	+	-	-
13	NP19	+	+	+	+	-	-	31	NP41	+	+	+	+	-	-	49	NP66	+	+	+	+	-	-
14	NP20	+	+	+	+	-	-	32	NP 42	+	+	+	+	-	-	50	NP67	+	+	+	+	-	-
15	NP25	+	+	+	+	-	-	33	NP 43	+	+	+	+	-	-	51	NP73	+	+	+	+	-	-
16	NP26	+	+	+	+	-	-	34	NP44	+	+	+	+	+	+	52	NP74	+	+	+	+	-	-
17	NP27	+	+	+	+	-	-	35	NP45	+	+	+	+	-	-								
18	NP28	+	+	+	+	-	-	36	NP46	+	+	+	+	+	+								

(+) tumbuh; (-) tidak tumbuh

Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Nira Aren [*Arenga pinnata* (Wurmb)]

Hasil uji ketahanan *Simulated Gastric Juice* (SGJ) selama 4 jam dan terhadap *Simulated Intestinal Juice* (SIJ) selama 6 jam menunjukkan isolat mampu bertahan terhadap paparan *Simulated Gastric Juice* (SGJ) selama 4 jam serta tahan pada paparan *Simulated Intestinal Juice* (SIJ) selama 6 jam, (Tabel 3 dan Gambar 1).

Hasil uji antagonis lebih terhadap 12 bakteri patogen seperti *Edwardsiella ictaluri*, *Escherichia coli* InaCC B5, *Aeromonas sobria*, *Salmonella enterica* JCM 1652, *Lysteria monocytogenes* JCM 7671, *Staphylococcus aureus* InaCC B4, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B3, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus cereus* InaCC B9,

Streptococcus agalactiae, *Aeromonas hydrophilla* menunjukkan ke enam isolat BAL mempunyai kemampuan antimikroba terhadap semua jenis bakteri patogen (antimikroba berspektrum luas) (Tabel 4).

Karakterisasi aktivitas enzim 6 isolat BAL kandidat probiotik menunjukkan 2 isolat (NP29 dan NP34) menghasilkan enzim protease dan amilase. Semua isolat tidak menghasilkan enzim selulase dan isolat NP29, NP33, NP44, NP46, NP57 menghasilkan enzim fitase (Tabel 5).

Kurva pertumbuhan keenam isolat BAL Nira Aren Papua menunjukkan isolat NP29, NP33, NP46, NP57 memiliki pola pertumbuhan yang cepat

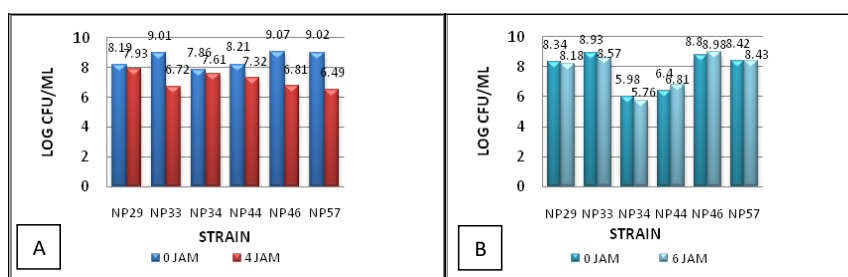
Tabel 3. Penghitungan jumlah sel hidup pada uji ketahanan isolat BAL terhadap *Simulated Gastric Juice* (SGJ) dan *Simulated Intestinal Juice* (SIJ).

No.	Kode isolat	SGJ (log cfu/mL)		SIJ (log cfu/mL)	
		Jam - 0	Jam - 4	Jam - 0	Jam - 6
1	NP29	8,19	7,93	8,34	8,18
2	NP33	9,01	6,72	8,93	8,57
3	NP34	7,86	7,61	5,98	5,76
4	NP44	8,21	7,32	6,40	6,81
5	NP46	9,07	6,81	8,80	8,98
6	NP57	9,02	6,49	8,42	8,43

Tabel 4. Hasil uji Antimikroba 6 isolat BAL kandidat probiotik terhadap 12 isolat bakteri patogen.

Isolat	Diameter zona hambat (mm)											
	EC	BC	LM	SE	PA	SA	EI	AS	PS	KP	AH	SAg
NP29	17,32	24,65	25,02	21,15	14,02	22,94	20,59	26,67	21,02	11,02	17,91	21,06
NP33	17,94	21,16	23,53	20,48	13,01	20,25	22,58	27,79	21,97	12,07	17,98	21,32
NP34	11,64	13,67	14,00	13,10	7,485	10,17	14,93	16,56	13,01	6,06	12,75	12,85
NP44	13,43	13,92	17,02	16,62	8,425	15,33	16,10	21,46	15,48	7,49	17,93	15,97
NP46	16,57	21,99	20,02	21,10	14,03	19,87	18,92	22,07	20,53	18,12	16,56	22,83
NP57	16,36	21,15	21,04	21,01	12,03	19,89	19,97	24,08	17,53	10,99	18,55	8,01
Tetrasiklin 30 µg	17,00	25,00	6,00	19,00	6,00	15,00	19,00	15,00	11,00	18,00	22,00	11,00
Gentamisin 10 µg	11,00	21,00	6,00	13,00	12,00	15,00	15,00	16,00	14,00	10,00	15,00	16,00

Keterangan: EC: *Escherichia coli* InaCC B5, BC: *Bacillus cereus* InaCC B9, LM: *Lysteria monocytogenes* JCM 7671, SE: *Salmonella enterica* JCM 1652, PA: *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B3, SA: *Staphylococcus aureus* InaCC B4, EI: *Edwardsiella ictaluri*, AS: *Aeromonas sobria*, PS: *Plesiomonas shigelloides*, KP: *Klebsiella pneumonia*, AH: *Aeromona hydrophilla*, SAg: *Streptococcus agalactiae*.



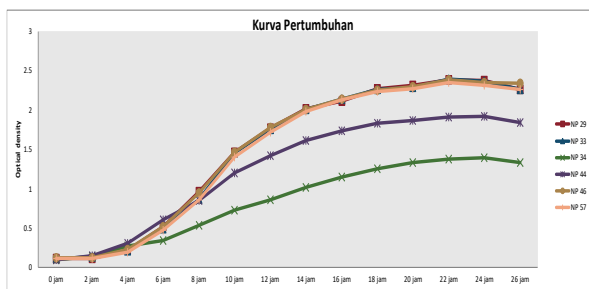
Gambar 1. Profil ketahanan sel BAL terhadap paparan *Simulated Gastric Juice* (SGJ) selama 4 jam (A) dan *Simulated Intestinal Juice* (SIJ) selama 6 jam (B)

sedangkan isolat NP44 pertumbuhannya lebih lambat dan isolat NP34 memiliki pola pertumbuhan lambat, Gambar 2.

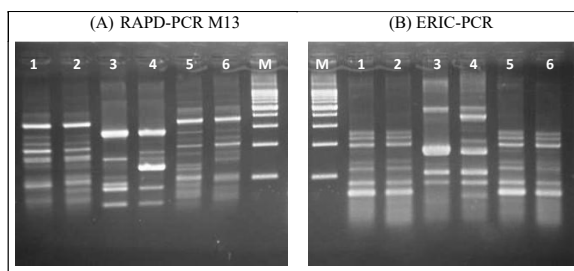
Hasil karakterisasi molekuler menggunakan RAPD-PCR M13 dan ERIC-PCR diperoleh 3 grup profil genetik dengan pola pita DNA yang bervariasi (Gambar 3). Hasil RAPD-PCR M13 menunjukkan pola pita DNA strain NP29, NP33, NP46, NP57 yang mirip (grup 1), sedangkan isolat NP34 (grup 2) dan NP44 (grup 3) menunjukkan pola pita DNA yang berbeda. Hal tersebut dikuatkan dengan hasil ERIC-PCR menunjukkan kemiripan pola pita DNA isolat NP 29, NP33, NP46, NP57 (grup 1) sedangkan strain NP34

(grup 2) dan NP44 (grup 3) menunjukkan pola pita DNA yang berbeda.

Identifikasi molekuler berdasarkan 16S rDNA pada 3 grup isolat BAL (Tabel 6) menunjuk grup 1 pada spesies *Lactobacillus plantarum* (NP29, NP33, NP46, NP57), grup 2 pada spesies *Lactobacillus casei* NP34, dan grup 3 pada spesies *Lactobacillus paracasei* NP44. Hasil analisis filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA menggunakan metode *Neighbor Joining* dan *Bacillus subtilis* sebagai *outgroup* (Gambar 4.), grup 1 berada dalam satu klade dengan spesies tipe-nya *Lactobacillus plantarum* JCM1149^T (D79210) dengan nilai *bootstrap* 100%, grup 2 berada dalam satu klade dengan spesies tipe-nya



Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri isolat BAL kandidat probiotik asal nira Aren Papua selama 26 jam.



Gambar 3. Profil RAPD-PCR M13 (A) dan ERIC-PCR (B) isolat bakteri asal laktat kandidat probiotik asal nira Aren dari Papua.

Keterangan: M: DNA ladder 0,5 K bp, 1: NP29, 2: NP33; 3: NP34, 4: NP44, 5: NP46, 6: NP57.

Tabel 5. Uji kualitatif aktivitas enzim pada 6 isolat BAL kandidat probiotik

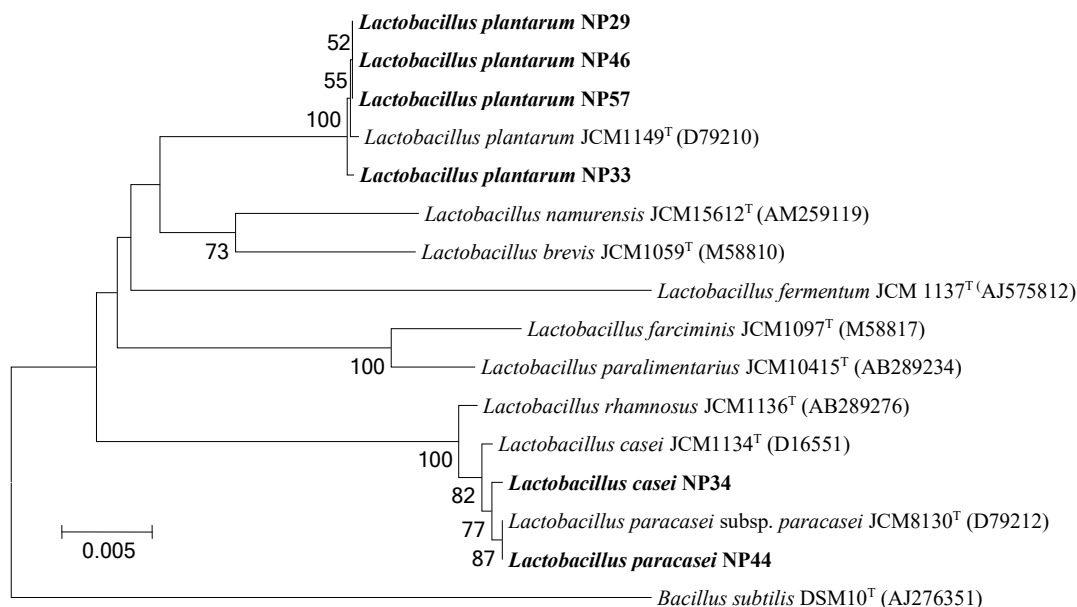
No.	Kode isolat	Protease			Amilase			Selulase			Fitase		
		ØZB (mm)	ØZK (mm)	Indeks protease	ØZB (mm)	ØZK (mm)	Indeks amilase	ØZB (mm)	ØZK (mm)	Indeks selulase	ØZB (mm)	ØZK (mm)	Indeks fitase
1	NP29	8	8	1	9	9	1	0	5	0	20	9	2,2
		9	9	1	9	9	1	0	5	0	20	9	2,2
2	NP33	0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4,4
		0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4,4
3	NP34	11	10	1,1	9	9	1	0	5	0	0	5	0
		10	9	1,1	10	10	1	0	5	0	0	5	0
4	NP44	0	9	0	0	9	0	0	5	0	15	5	3
		0	9	0	0	9	0	0	5	0	15	5	3
5	NP46	0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4
		0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4
6	NP57	0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4
		0	9	0	0	9	0	0	5	0	22	5	4

Keterangan: ØZB=diameter zona bening, ØZK=diameter koloni bakteri

Tabel 6. Hasil identifikasi molekuler berdasarkan data sekuen 16S rDNA pada isolat kandidat probiotik

Kode isolat	Spesies berdasarkan data sekuen 16S rDNA	Homologi dengan spesies terdekat (%)	Asesi No Genbank
NP29	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	MK687387
NP33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	CP023301
NP34	<i>Lactobacillus casei</i>	99.93	KF673503
NP44	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100	MK774553
NP46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	MK774609
NP57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	MK774609

Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Nira Aren [*Arenga pinnata* (Wurmb)]



Gambar 4. Pohon filogenetik 6 isolat bakteri asal laktat kandidat probiotik asal nira Aren dari Papua berdasarkan sekuen 16S rDNA menggunakan metode *Neighbor Joining* dan *Bacillus subtilis* sebagai *outgroup*.

Lactobacillus casei JCM1134^T (D16551) dengan nilai *bootstrap* 100% dan grup 3 dalam satu klade dengan spesies tipe-nya *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM8130^T (D79212) dengan nilai *bootstrap* 87%.

PEMBAHASAN

Keberadaan BAL dalam nira mempunyai potensi untuk diseleksi sebagai kandidat probiotik. Jumlah BAL yang cukup banyak dalam nira memberikan peluang besar diperolehnya kandidat probiotik. Toleransi terhadap asam dan garam empedu merupakan dua syarat dasar mikroorganisme probiotik untuk bertahan hidup di saluran pencernaan bagian atas, terutama kondisi asam di lambung dan garam empedu di usus kecil (Choi & Chang 2015; FAO/WHO 2002). BAL harus mampu bertahan terhadap paparan garam empedu supaya dapat hidup dan melakukan perannya di dalam usus halus. Garam empedu (0,3%-0,5%) pada hati disekresikan untuk menguraikan lemak menjadi senyawa asam lemak yang lebih sederhana agar dapat diserap tubuh (Noriega *et al.* 2004). Semua mikroba yang dapat bertahan hidup setelah ditumbuhkan dalam media yang ditambahkan 0,3% *oxgall* dinyatakan memiliki resistensi terhadap garam empedu. Konsentrasi *oxgall* sebesar 0,3% merupakan konsentrasi kritikal, nilai yang cukup tinggi untuk menyeleksi strain yang resisten terhadap garam empedu (Jacobsen *et al.* 1999). Hasil isolasi dari nira Aren Papua diperoleh 52 isolat BAL. Semua isolat tahan

terhadap garam empedu 0,1% dan 0,2% sedangkan pada konsentrasi garam empedu 0,3% hanya 6 isolat yang bertahan hidup yaitu NP 29, NP 33, NP 34, NP 44, NP 46, NP 57. Kemampuan BAL bertahan terhadap garam empedu dikarenakan adanya enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) dapat menghidrolisis garam empedu terkonjugasi dan mengubah sifat fisika-kimia garam empedu sehingga tidak lagi bersifat racun bagi BAL (Du Toit *et al.* 1998).

Salah satu persyaratan lain isolat BAL untuk menjadi probiotik yaitu tahan terhadap asam lambung. Sebelum isolat tersebut masuk ke dalam saluran pencernaan manusia, maka harus melewati lambung dan harus mampu bertahan dari pH asam lambung yaitu sekitar 2,5 (Jacobsen *et al.* 1999). Asam lambung terdiri atas air (97-99%), musin (lendir), garam anorganik, dan enzim pencernaan (pepsin, renin, dan lipase). Ketahanan BAL terhadap pH rendah diuji selama 4 jam, merupakan waktu yang dibutuhkan makanan transit dalam lambung sekitar 2-6 jam (Oozer *et al.* 2006). Jacobsen *et al.* (1999) menyebutkan BAL yang mampu tumbuh pada pH 2,5 berpotensi sebagai probiotik. Isolat BAL asal nira Aren (NP 29, NP 33, NP 34, NP 44, NP 46 dan NP 57) tahan terhadap pH rendah 2,5, sehingga memenuhi salah satu persyaratan sebagai probiotik.

Bakteri probiotik masuk melalui mulut kemudian masuk ke lambung dan usus. Dalam perjalanannya menuju usus, bakteri probiotik mengalami berbagai hambatan. Ketika memasuki

lambung, sebagian besar bakteri mengalami kematian akibat adanya cairan lambung seperti HCl dan enzim pencernaan. Hambatan berikutnya terjadi dalam usus halus terutama pada usus dua belas jari (duodenum). Pelepasan cairan empedu dan pankreas yang berguna untuk mencerna lemak, protein serta gula juga dapat menyebabkan matinya sejumlah bakteri (Lian *et al.* 2003). *Simulated Gastric Juice* (SGJ) merupakan larutan yang dibuat menyerupai cairan di dalam lambung atau sering disebut sebagai cairan lambung sintesis yang mengandung pepsin dengan pH 2,5 sedangkan *Simulated Intestinal Juice* (SIJ) merupakan larutan yang dibuat menyerupai cairan di dalam usus yang mengandung pankreatin dan *oxgall*. Tujuan pengujian SIJ dan SGJ ini yang dilakukan untuk lebih memastikan strain BAL terpilih dapat bertahan terhadap simulasi cairan lambung dan cairan usus sehingga BAL tersebut dapat melakukan perannya di dalam usus seperti yang dikemukakan Zhang *et al.* (2016) bahwa probiotik harus dapat hidup ketika melewati lambung dan harus dapat berkoloni di usus agar dapat memberikan efek pada tubuh. Hasil pengujian SGJ (Tabel 4) pada jam ke-0, isolat BAL tumbuh baik log 7,86 - 9,07 cfu/mL dan pada jam ke-4 jumlah sel hidup mengalami sedikit penurunan yaitu log 6,49-7,93 cfu/mL, Gambar 1. Secara umum masih tumbuh dengan baik dengan ketahanan hidup di atas 75%. Hasil pengujian SIJ (Tabel 4), sel BAL pada jam ke-0 tumbuh log 5,98- 8,93 cfu/mL dan pada jam ke-6 sebanyak 5,76-8,98 cfu/mL, Gambar 2. BAL tidak terpengaruh terhadap perlakuan SIJ dan mampu tumbuh dengan baik.

Probiotik harus memiliki aktivitas antagonistik terhadap mikroba patogen enterik (Shortt 1999). Amezcuita & Brashears (2002) menyebutkan BAL menghasilkan beberapa komponen antimikroba yaitu asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin. Menurut Alakomi *et al.* (2000) mekanisme BAL dalam menghambat bakteri patogen dengan cara menghasilkan asam-asam organik. Asam organik akan berdifusi pasif ke dalam sel bakteri dengan cara merusak ion pada permukaan sel bakteri target. Setelah permukaan sel target tersebut rusak, senyawa metabolit yaitu asam organik BAL akan menghambat transport substrat, produksi energi, sintesis makromolekul, dan keseimbangan cairan sitoplasma bakteri target. Uji antimikroba BAL asal nira Aren Papua terhadap 12 bakteri patogen *Edwardsiella ictaluri*, *Escherichia coli* InaCC B5, *Aeromonas sobria*, *Salmonella enterica* JCM 1652, *Lysteria monocytogenes* JCM 7671, *Staphylococcus aureus* InaCC B4, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B3, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus cereus* InaCC B9, *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophilla* menunjukkan BAL mampu menghambat semua bakteri patogen

dalam uji dengan nilai zona hambat beragam. Isolat NP29 mampu menghambat terkuat pada 4 bakteri patogen (*L. monocytogenes* JCM 7671, *S. enterica* JCM 1652, *S. aureus* InaCC B4, dan *E. ictaluri*), dan isolat NP46 menghambat terkuat pada 4 bakteri patogen (*P. aeruginosa* InaCC B3, *S. agalactiae*, *P. shigelloides*, dan *K. pneumonia*). Sedangkan Kontrol antibiotik Tetrasiklin 30 µg hanya memiliki nilai hambat terkuat pada 2 bakteri patogen (*B. cereus* InaCC B9 dan *A. hydrophilla*) (Tabel 4).

Aktivitas enzimatik BAL mendapat pertimbangan dalam seleksi probiotik. Bakteri probiotik dalam pakan dapat memainkan peran untuk mendukung pertumbuhan terkait rasio konversi pakan, rasio efisiensi protein, pencernaan, dan lainnya (Allameh *et al.* 2017). Probiotik yang memiliki aktivitas enzimatik dapat meningkatkan pencernaan (Taheri *et al.* 2009). Probiotik yang menghasilkan beberapa enzim eksogen akan membantu inang dalam mencerna makanan misalnya amilase, protease, dan fitase. Enzim menghidrolisis makanan dengan memecah karbohidrat, protein, dll. Dekonstruksi dari molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana akan memudahkan pencernaan dan penyerapan (meningkatkan daya cerna makanan) dan meningkatkan pertumbuhan (Putra & Widanarni 2015). Berdasarkan analisis menunjukkan 6 isolat BAL kandidat probiotik, isolat NP29 dan NP34 mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim protease dan amilase dan isolat NP29, NP33, NP44, NP46, dan NP57 menghasilkan enzim fitase.

BAL yang dijadikan probiotik salah satunya harus memiliki kemampuan kecepatan pertumbuhan yang baik agar dapat melakukan perannya di dalam saluran pencernaan. Akan tetapi kecepatan pertumbuhan BAL tidak mutlak harus dijadikan pilihan untuk memilih kandidat probiotik. Syarat-syarat yang lain juga menjadi pertimbangan dalam memilih kandidat probiotik (FAO/WHO 2001). Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat NP29, NP33, NP46, NP57 memiliki pola pertumbuhan yang cepat, diikuti NP44 dan isolat NP34.

Saito *et al.* (2011) melaporkan teknik RAPD-PCR dan ERIC-PCR merupakan teknik molekuler yang cepat dan sederhana yang dapat digunakan untuk membedakan strain BAL. Kebutuhan diskriminasi atau klasifikasi sampai ke tingkat strain/genotip sangat diperlukan agar mampu mengelompokkan isolat-isolat mikroba yang berpotensi. Pozo-Bayon *et al.* (2009) menyebutkan penggunaan teknik molekuler memungkinkan pengelompokan intraspesifik/intraspecies untuk dilakukan. Hasil karakterisasi molekuler menggunakan RAPD-PCR M13 dan

ERIC-PCR diperoleh profil genetik berupa pola pita DNA yang bervariasi (Gambar 3). Hasil RAPD-PCR M13 dan ERIC-PCR menunjukkan menjadi 3 grup profil genetik, meliputi NP29, NP33, NP46, NP57 (grup 1), NP34 (grup 2) dan NP44 grup (3). Keragaman pola pita DNA tersebut dimungkinkan adanya persamaan dan perbedaan genomik dalam spesies.

Identifikasi molekuler berdasarkan 16S rDNA (Tabel 6) pada 3 grup BAL tersebut menunjuk pada 3 spesies yaitu grup 1 spesies *Lactobacillus plantarum* (isolat NP29, NP33, NP46, NP57), grup 2 spesies *Lactobacillus casei* NP34, dan grup 3 spesies *Lactobacillus paracasei* (isolat NP44). Keenam isolat tersebut selanjutnya didepositkan di pusat koleksi mikroorganisme InaCC (Indonesian Culture Collection) Pusat Penelitian Biologi - LIPI. Pada analisis filogenetik (Gambar 4.) menguatkan hasil identifikasi molekuler menunjukkan grup 1 merupakan spesies *Lactobacillus plantarum* karena berupa satu klade dengan strain tipe-nya dengan nilai *bootstrap* yang kuat (100%). Demikian juga grup 2 adalah spesies *Lactobacillus casei* karena berupa satu klade dengan strain tipe-nya dengan nilai *bootstrap* yang kuat (100%) dan grup 3 merupakan spesies *Lactobacillus paracasei* karena berupa satu klade dengan strain tipe-nya dengan nilai *bootstrap* yang kuat (87%).

Lactobacillus plantarum banyak ditemukan di nira Aren asal Papua. Hal ini dimungkinkan karena komposisi kimia dari nira Aren sangat mirip dengan nira lainnya. Sukrosa adalah gula utama dalam nira dan merupakan substrat fermentasi alami bagi BAL, khamir, dan bakteri asam asetat (Santiago-Urbina & F. Ruíz-Terán 2014). Beberapa spesies BAL lainnya ditemukan dari minuman fermentasi nira (*Elaeis guineensis*) di Ghana: *Lactobacillus plantarum* dan *Leuconostoc mesenteroides* (Amoa-Awua *et al.* 2006), dari nira (*Phoenix dactylifera*) di Tunisia: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* dan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Manel *et al.* 2011), dari nira (*Borassus akeassii*): *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, dan *Leuconostoc mesenteroides*, *Fructobacillus durionis*, *Lactobacillus nagelii*, dan *Streptococcus mitis* (Ouoba *et al.* 2012), dari nira (*Elaeis guineensis*): *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus casei* strain zhang, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus parvulus* strain Bpe-299 (Okolie *et al.* 2013), dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* Linn.) Kupang: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *Fructobacillus durionis* dan *Fructobacillus fructosus* (Sulistiani 2018).

KESIMPULAN

Nira Aren asal Papua mengandung jumlah BAL yang cukup banyak $1,65 \times 10^7$ cfu/mL dan diperoleh 6 isolat BAL (NP29, NP33, NP34, NP44, NP46) mempunyai potensi dan memenuhi kriteria sebagai kandidat probiotik (isolat memiliki aktivitas antimikroba, tahan terhadap pH rendah, garam empedu, *simulated gastric juice* dan *simulated intestinal juice*). Profil genetik dan identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat terbagi menjadi 3 grup yaitu meliputi grup 1 (NP29, NP33, NP46, NP57) teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, grup 2 (NP34) teridentifikasi sebagai *L. casei* dan grup 3 (NP44), teridentifikasi sebagai *L. paracasei*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang telah mendanai penelitian melalui proyek DIPA dan semua pihak yang telah mendukung dan membantu dalam kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alakomi, HL., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, & IM. Helander 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 2001-2005.
- Al-Allaf, MAH., AMM. Al-Rawi & AT. Al-Mola. 2009. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 23(I): 115-117.
- Allameh, SK, V. Noaman & R. Nahavandi. 2017. Effects of probiotic bacteria on fish performance. *Advanced Techniques in Clinical Microbiology* 1(2): 1-5.
- Amezquita, A. & MM. Brashears, 2002. Competitive inhibition of *Listeria monocytogene* in ready to eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 65(2): 316-325.
- Amoa-Awua, WK., E. Sampson & K. Tano-Debrah. 2007. Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology* 102: 599-60
- Choi, E. & HC. Chang. 2015. Cholesterol-lowering effect of putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWI-food science and*

- technology* 62: 210-217.
- Efron, B. 1979. Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *The Annals of Statistics* 7: 1-26.
- FAO/WHO Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2001. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Amerian Córdoba Park Hotel. Córdoba. Argentina.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Jacobsen, CN., VR. Nielsen, AE. Hayford, PL. Møller, KF. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandstrom, M. Tvede & M. Jakobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of lactobacillus spp. By in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11): 4949-4956.
- Kim, E., Y. Kim, M. Rhee, J. Song, K. Lee, K. Kim, S. Lee, I. Lee & S. Park. 2007. Selection of *Lactobacillus* sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. *Journal of General and Applied Microbiology* 53: 111-117.
- Lian, WC, HC. Hsiao & CC. Chou. 2003. Viability of microencapsulation bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*. 86 (3): 293-301.
- Manel Z., M. Sana, K. Nedja, H. Moktar & F. Ali. 2011. Microbiological analysis and screening of lactic acid bacteria from Tunisian date palm sap. *African Journal of Microbiology Research* 5 (19): 2929-2935.
- Naknean, P., M. Meenune & G. Roudaut. 2010. Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. *International Food Research Journal* 17: 977-986.
- Nikolova, D., Y. Evstatieva, R. Georgieva, S. Danova, V. Savov, S. Ilieva & P. Dalev. 2009. Molecular taxonomic characterisation of probiotic strain *Lactobacillus* sp. 50 P1. *Biotechnology & Biotechnology XI Anniversary Scientific Conference*: 779-782.
- Noriega, L., M. Gueimonde, B. Sánchez, A. Margolles & CG. de los Reyes-Gavilán, 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Journal of Food Microbiology* 94(1): 79–86.
- Okolie, PI., CN. Opara, EC. Emerenini & SVA. Uzochukwu. 2013. Evaluation of bacterial diversity in palm wine by 16S rDNA analysis of community DNA. *Nigerian Food Journal* 31(1): 83-90.
- Oluwajoba, S.O., FA.Akinyosoye & VO. Oyetayo, 2013. *In vitro* screening and selection of probiotic lactic acid bacteria strained from spontaneously fermenting Kunu-Zaki. *Advances in Microbiology* 3: 309-316.
- Ouoba, LII., C. Kando, C. Parkouda, H. Sawadogo-Lingani, B. Diawara & JP. Sutherland. 2012. The microbiology of bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1428-1441.
- Oozer R., A. Leplingard, DDG. Mater, A. Mogenet, R. Michelin, I. Seksek, P. Marteau, J. Dore, JL. Bresson & G. Corthier. 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 72 (8): 5615-5617.
- Pozo-Bayón, MA., I. Pardo, S. Ferrer & MV. Moreno-Arribas. 2009. Molecular approaches for the identification and characterisation of oenological lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology* 8 (17): 3995-4001.
- Putra, AN. & Widanarni. 2015. Screening of amyolytic bacteria as candidates of probiotics in Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Research Journal of Microbiology* 10 (1): 1-13.
- Rossetti, L. & G. Giraffa. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M 13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* 63: 135-144.
- Santiago-Urbina, JA. & F. Ruíz-Terán, 2014. Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *International Food Research Journal* 21 (4): 1261-1269.
- Shortt C. 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science and Technology* 10: 41-417.
- Sulistiani. 2018. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from palm sap (*Borassus flabellifer* Linn.) origin Kupang, East Nusa Tenggara. *Inventing Prosperous*

- Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management AIP Conference Proceedings 2002: 020059-1–020059-9.*
- Okada, S., W. Daengsubha & T. Uchimura. 1986. Flora Of Lactic Acid Bacteria In Miang Produced In Northern Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology* 32: 57-65
- Tagg JR. & AR. McGiven. 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied microbiology* 21 (5): 943.
- Taheri, HR., H. Moravej, F. Tabandeh, M. Zaghari & M. Shivazad. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Science* 88: 1586-1593.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731-2739.
- Tokatli, M., G. Gülgör, SB Elmaci, NA. Isleyen & F. Özçelik. 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*: 1 -8.
- Valder, R. & KP. Nooralabettu. 2018 Microbial characteristics of freshly tapped Palmyra Palm (*Borassus flabellifer*) sap. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 9 (1): 347-353.
- Zhang, B., Y. Wang, Z. Tan, Z. Li, Z. Jiao & Q. Huang. 2016. Screening of probiotic activities of *Lactobacilli* strains strained from traditional Tibetan Qula, A Raw Yak Milk Cheese. *Asian Australas. Journal of Animal Science*. 29(10): 1490-1499.

