



KAJIAN MOLEKULER PADA PROBIOTIK ASAL AIR SUSU IBU DALAM SINTESIS EKSOPOLISAKARIDA (EPS)

Molecular Studies on Probiotic of Human Breast Milk in the Synthesis of Exopolysaccharide (EPS)

Hamiyawati Qoimatu Dini Alfaruqi*, Nosa Septiana Anindita, Arif Bimantara

Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta,
Mlangi Nogotirto, Jl. Siliwangi Jl. Ringroad Barat No.63, Daerah Istimewa Yogyakarta 55592

*Email: miaalfaruqi@gmail.com

ABSTRACT

The glucosyltransferase (gtf) gene has an important role in exopolysaccharide (EPS) synthesis in probiotic bacteria. The EPS produced is associated with the adhesion ability of bacteria to the intestinal mucosa. Therefore, the gtf gene can be used as a parameter in the selection of potential probiotic through a molecular approach. This study was conducted to determine the presence of the gtf gene in probiotic from human breast milk using PCR technique. The methods in this study include the following: reculture of probiotic isolates, DNA isolation, amplification of the 16S rRNA gene using universal primers (pA and pB), amplification of specific LAB primers (LABfw and LABrv), specific primary design for the gtf gene, and the amplification of the gtf gene. The results of 16S rRNA gene amplification using universal primers obtained the amplicons of 500-1,000 bp in size. The results of amplification using specific LAB primers obtained an amplicon of about 700 bp in all isolates. The results of amplification of the gtf gene using a specific primer produced an amplicon of 325 bp in all isolates. Based on this study, it was concluded that 16 probiotic isolates from human breast milk were proven to have the gtf gene.

Keywords: exopolysaccharide, human breast milk, gtf gene, PCR, probiotic

ABSTRAK

Gen *glukosiltransferase (gtf)* memiliki peran penting dalam sintesis eksopolisakarida (EPS) pada bakteri probiotik. EPS yang diproduksi berhubungan dengan kemampuan *adhesi* bakteri pada mukosa usus. Oleh karena itu, gen *gtf* dapat dijadikan sebagai salah satu parameter dalam seleksi probiotik potensial melalui pendekatan molekuler. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya gen *gtf* pada probiotik asal air susu ibu (ASI) menggunakan teknik PCR. Metode pada penelitian ini meliputi: *reculture* isolat probiotik, isolasi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal (pA dan pB), amplifikasi primer spesifik BAL (LABfw dan LABrv), desain primer spesifik untuk gen *gtf* dan amplifikasi gen *gtf*. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal diperoleh amplicon berukuran antara 500-1.000 bp. Adapun hasil amplifikasi menggunakan primer spesifik BAL diperoleh amplicon berukuran sekitar 700 bp pada seluruh isolat. Hasil amplifikasi gen *gtf* menggunakan primer spesifik menghasilkan amplicon berukuran sekitar 325 bp pada seluruh isolat. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa 16 isolat probiotik asal ASI terbukti memiliki gen *gtf*.

Kata Kunci: air susu ibu (ASI), eksopolisakarida, gen *gtf*, PCR, probiotik

PENDAHULUAN

Seiring dengan meningkatnya kesadaran akan gaya hidup sehat, pengaturan konsumsi pangan sehat seperti pangan fungsional mulai menjadi *trend* di masyarakat saat ini. Salah satu sifat fungsional dalam pangan fungsional disebabkan karena adanya kandungan mikroorganisme yang memiliki sifat probiotik (Tamang et al. 2016), yang dapat memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan, di antaranya mencegah *lactose intolerance* dan kanker, meningkatkan respons imun serta mampu menurunkan kolesterol darah (Vanniyasingam et al. 2019). Umumnya, bakteri probiotik diisolasi dari produk pangan fermentasi. *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan kelompok bakteri asam laktat (BAL) yang banyak dipelajari dan memiliki kemampuan sebagai probiotik (Gharbi et al. 2018) serta termasuk ke dalam daftar *generally recognized as safe* (GRAS) (Masalam et al. 2018). Namun selain bersumber dari bahan pangan, probiotik juga dapat diisolasi dari material manusia, seperti air susu ibu (ASI).

ASI merupakan sumber nutrisi lengkap untuk perkembangan bayi baru lahir. ASI tidak hanya memberikan perlindungan pasif, tetapi juga dapat memodulasi perkembangan imunologis pada bayi melalui faktor mikroba (Le Doare et al. 2018). BAL dan *Bifidobacteria* dari ibu menyusui dapat meningkatkan perkembangan mikroflora usus bayi untuk ketahanan dan dapat mencegah risiko diare (Gomez-Gallego et al. 2016). Menurut Anindita (2020), BAL yang diisolasi dari ASI memiliki viabilitas tinggi pada saluran pencernaan karena berasal dari material manusia dan lebih adaptif jika diaplikasikan dalam produk pangan, sehingga dapat dikategorikan sebagai probiotik potensial.

Tidak semua BAL memiliki sifat probiotik yang dapat bertahan hidup dalam berbagai kondisi fisiologis pada saluran pencernaan. Karakteristik umum bakteri yang memiliki potensi sebagai probiotik di antaranya memiliki kemampuan dalam mencapai lokasi target di dalam inang (saluran *gastrointestinal*), tahan terhadap pH rendah dan garam empedu, kemampuan adhesi (penempelan) serta menghasilkan senyawa bakteriosin (Stack et al. 2010; Reis

et al. 2016). Kemampuan adhesi pada mukosa usus dianggap sebagai prasyarat untuk kolonisasi, sehingga menjadi salah satu karakteristik yang paling penting untuk seleksi probiotik yang baru diisolasi.

Kemampuan dalam adhesi pada mukosa usus disebabkan karena bakteri probiotik dapat mensekresikan senyawa eksopolisakarida (EPS). EPS berfungsi dalam memberikan perlindungan pada bakteri terhadap kondisi lingkungan yang berbahaya, dapat dijadikan sebagai cadangan karbon dan energi (Surayot et al. 2014), serta memiliki potensi sebagai prebiotik (Castro-Bravo et al. 2018). Kemampuan bakteri probiotik dalam mensekresikan EPS menjadi informasi penting dimana telah banyak dilaporkan terkait manfaatnya bagi kesehatan, di antaranya sebagai anti-mag, aktivitas antioksidan, anti-tumor, *anti-ulcer*, imunomodulator, penurun kolesterol, anti-diabetes dan anti-viral (Kim et al. 2010; Tabibloghmany dan Ehsandoost 2014; Angelin dan Kavitha 2020).

Produksi EPS pada probiotik berhubungan dengan gen penyandi enzim yang berperan dalam reaksi pembentukan EPS, salah satunya yaitu gen *glukosiltransferase* (*gtf*) yang menyandi enzim glukosiltransferase. Menurut Heng et al. (2017), sintesis EPS pada probiotik dapat dipengaruhi oleh beberapa gen *gtf* seperti pada *Weissella confusa* MBF8-1 yang diisolasi dari produk kedelai dipengaruhi oleh gen *gtf8-1A* dan *gtf8-1B*. Fukao et al. (2019) juga melaporkan produksi EPS pada *L. brevis* KB290 asal acar tradisional Jepang *Suguki*, dipengaruhi oleh gen *gtf27*, *gtf28* dan *orf29*.

Eksplorasi probiotik asal ASI yang memiliki gen *gtf* masih jarang dilakukan. Rajoka et al. (2018) dan Bagci et al. (2019) telah melakukan eksplorasi probiotik asal ASI, namun masih dalam tahap isolasi, identifikasi dan produksi EPS. Sedangkan pencarian gen *gtf* yang berperan dalam biosintesis EPS belum dilakukan. Anindita (2020) telah berhasil membuktikan bakteri probiotik dari *W. confusa* strain AS3, AS14, AS18 dan AS21 memiliki gen *gtf* melalui metode PCR menggunakan primer *degenerate* DegFor dan DegRev. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining gen *gtf* pada genus *Lactobacillus*, *Weissella* dan *Pediococcus* asal ASI menggunakan primer

spesifik gen *gtf* dengan metode PCR. Penemuan gen *gtf* diharapkan dapat berkontribusi pada keragaman enzim yang terlibat dalam biosintesis EPS sehingga dampaknya akan memperkaya variasi polimer EPS. Selain itu, potensi isolat probiotik *indigenous* ASI ini diharapkan memiliki kemampuan adaptasi tinggi terhadap kondisi lokal dan terjamin ketersediaannya untuk pembuatan pangan fungsional.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Agustus 2020 di Laboratorium Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada. Tahap *reculture* dilakukan di Laboratorium Teknologi Pengolahan Susu dan Telur, sedangkan untuk tahap isolasi DNA dan analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Ternak.

Bahan

Sampel yang digunakan adalah isolat probiotik dari penelitian sebelumnya yang dilakukan Anindita et al. (2018), yaitu diisolasi dari ASI berumur antara 7 sampai 14 hari pasca kelahiran dengan usia ibu 24 sampai 28 tahun dari salah satu rumah sakit di wilayah Yogyakarta. Bahan lain yang digunakan untuk pengujian adalah medium MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) (Merck, Jerman), *bile salt* 0,15% (Difco), FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen), *GoTaq Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific), *nuclease free water* (NFW) (Thermo Scientific), pasangan primer (Tabel 1), agarose (Promega, Madison USA), DNA *loading dye* (Thermo Scientific), buffer Tris-borat-EDTA (TBE) dan etidium bromida (Merck).

Reculture isolat probiotik

Reculture isolat probiotik mengacu pada metode Reis et al. (2016) dengan modifikasi. Proses *reculture* dilakukan pada medium MRSB yang telah disuplementasi *bile salt* 0,15%, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dalam lingkungan anaerob.

Isolasi DNA genom probiotik

Isolasi DNA probiotik dilakukan dengan mengikuti protokol pada kit FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction (Favorgen 2018). Sampel isolat dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril untuk dilakukan setrifugasi. Hasil sentrifugasi menunjukkan terjadinya pemisahan lapisan sebagai supernatan dan pellet. Supernatan dibuang, kemudian pellet sel yang diperoleh diresuspensi dalam larutan buffer lisis dan lisozim untuk proses lisis sel. Proteinase K dan RNase ditambahkan untuk degradasi protein dan RNA. Etanol absolut 96% dingin ditambahkan untuk proses DNA *binding* dalam FATG *mini column*. Selanjutnya, proses pencucian menggunakan *wash buffer* dilakukan sebanyak dua kali pengulangan untuk mendapatkan DNA murni. Kemudian DNA dielusi menggunakan *elution buffer* dan dilarutkan di dalam NFW.

Kualitas DNA genom dianalisis melalui uji kualitatif dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1% dalam 1x buffer TBE. Sampel DNA dielektroforesis bersama dengan DNA *ladder* 1 kb dengan tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil elektroforesis selanjutnya divisualisasi menggunakan *UV illuminator*. Pita DNA akan tampak pada gel agarose yang menandakan keberadaan DNA. Selanjutnya DNA hasil isolasi dari isolat probiotik ini akan digunakan sebagai *template* DNA pada proses amplifikasi.

Tabel 1. Jenis primer yang digunakan dalam proses amplifikasi gen 16S rRNA dan gen *gtf*

Primer	Oligonukleotida (5' – 3')	Target Gen	Referensi
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	(Anindita et al. 2018)
pB	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	16S rRNA	(Anindita et al. 2018)
LABfw	A0047AGTTTGATYDTGGCTCAG	16S rRNA	(Malik et al. 2010)
LABrv	CACCGCTACACATGGAG	16S rRNA	(Malik et al. 2010)
Forward	TGGGATCAGTCGCGACAAAG	<i>gtf</i>	Hasil desain penelitian
Reverse	CTCCCGTGGCATAATCCCGG	<i>gtf</i>	Hasil desain penelitian

Identifikasi genotipik

Amplifikasi gen 16S rRNA mengacu pada metode Anindita et al. (2018) menggunakan primer universal yaitu *forward* pA dan *reverse* pB. Total volume reaksi PCR dalam tabung PCR adalah 25 µL dengan komposisi 12,5 µL GoTaq® Green Master Mix, 9,5 µL NFW, 1 µL *template* DNA dari isolat probiotik serta 1 µL dari masing-masing primer *forward* dan *reverse*. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan pengaturan suhu pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama 30 detik, *extension* 72 °C selama 45 detik dan *final extension* 72 °C selama 5 menit.

Produk PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 1,5% dalam 1x buffer TBE. Sampel dielektroforesis bersama dengan DNA *ladder* 100 bp dengan tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya ampikon pada gel agarose dengan ukuran sekitar 500–1.000 bp.

Konfirmasi BAL

Amplifikasi gen spesifik BAL dilakukan menggunakan primer spesifik BAL LABfw (SD-Bact-0011-aS-17) dan LABrv (SG-Lab-0677-aA-17) (Malik et al. 2009). Total volume reaksi PCR dalam tabung PCR adalah 25 µL dengan komposisi 12,5 µL GoTaq® Green Master Mix, 9,5 µL NFW, 1 µL *template* DNA dari isolat probiotik serta 1 µL dari masing-masing primer *forward* dan *reverse*. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan pengaturan suhu pre-denaturasi 95 °C selama 3 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 54 °C selama 45 detik, *extension* 72 °C selama 2 menit dan *final extension* 72 °C selama 2 menit.

Produk PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 1,5% dalam 1x buffer TBE. Sampel dielektroforesis bersama dengan DNA *ladder* 100 bp dengan tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya ampikon pada gel agarose dengan ukuran sekitar 700 bp.

Desain primer gen *gtf*

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *gtf* adalah primer spesifik yang didesain dari beberapa jenis gen *gtf*. Desain primer dilakukan dengan membandingkan sekuen *gtf* *L. casei* W56

(CCK21852.1), *gtf8-1A* *W. confusa* MBF8-1 (FJ436354.1), *gtf-1B* *W. confusa* MBF8-1 (FJ460018.1) dan *GTF8-2* *W. confusa* (FJ478145.1) yang diperoleh dari database *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Proses pensejajaran (*alignment*) dari ke-4 sekuen gen *gtf* dilakukan menggunakan program *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Gambar 1). Selanjutnya, spesifisitas primer dianalisis dengan program Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Adapun sifat primer, seperti *melting temperature* (T_m), kandungan GC, potensi *dimmer* dan pembentukan *hairpin loop* dianalisis menggunakan *OligoAnalyzer Tool* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>).

Skринing gen *gtf*

Amplifikasi gen *gtf* mengacu pada metode Anindita (2020) dengan modifikasi. Primer yang digunakan adalah sepasang primer spesifik gen *gtf* hasil desain pada penelitian ini. Total volume reaksi PCR adalah 25 µL dengan komposisi 12,5 µL GoTaq® Green Master Mix, 9,5 µL NFW, 1 µL *template* DNA dari isolat probiotik serta 1 µL dari masing-masing primer *forward* dan *reverse*. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dengan pengaturan suhu pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama 45 detik, *extension* 72 °C selama 45 detik dan *final extension* 72 °C selama 5 menit.

Produk PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 1,5% dalam 1x buffer TBE. Sampel dielektroforesis bersama dengan DNA *ladder* 100 bp dengan tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya ampikon pada gel agarose dengan ukuran sekitar 325 bp.

Analisis data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis menggunakan metode deskriptif kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA genom probiotik

Sebanyak 16 isolat probiotik asal ASI yang terdiri dari 4 isolat *L. casei*, 5 isolat *L. paracasei*, 2 isolat *L. plantarum*, 1 isolat *W. confusa*, 1 isolat *P. acidilactici* dan 3 isolat *P.*

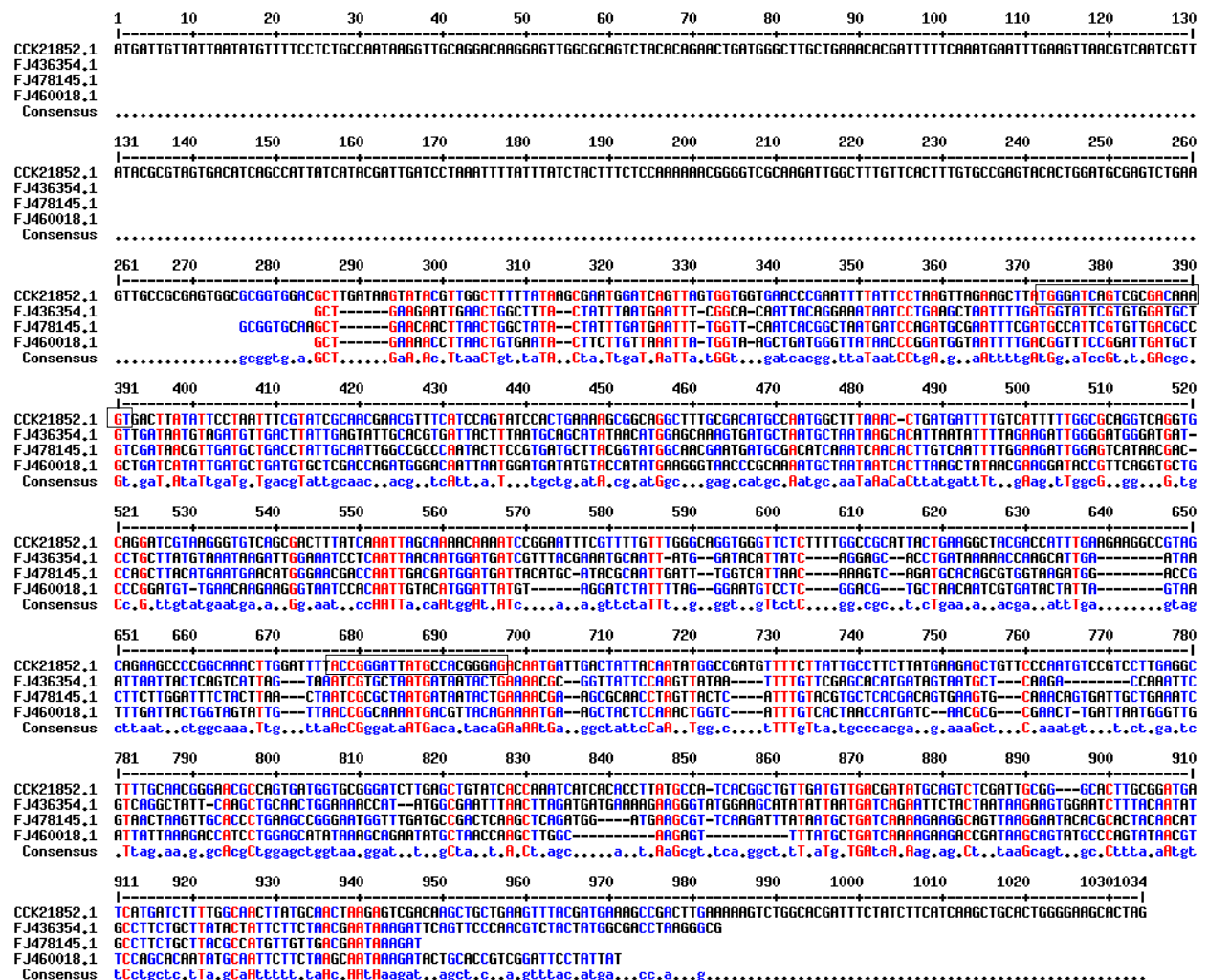
pentosaceus dipilih berdasarkan kriteria probiotik terbaik melalui beberapa parameter uji *in vitro* yang telah dilakukan Anindita et al. (2018). Adapun parameter uji yang digunakan, yaitu ketahanan terhadap pH rendah, garam empedu, penghambatan terhadap bakteri patogen dan pemanfaatan prebiotik inulin.

Isolasi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA dari isolat probiotik asal ASI. Keberhasilan dan kualitas DNA genom hasil isolasi dapat dilihat melalui uji kualitatif menggunakan metode elektroforesis pada gel agarose 1%. DNA genom dari 16 isolat probiotik asal ASI berhasil diisolasi yaitu ditandai dengan munculnya pita DNA pada gel agarose (Gambar 2). Tebal dan tipisnya pita DNA yang muncul mengindikasikan tinggi dan rendahnya konsentrasi DNA yang didapatkan. Adapun *smear* yang terdapat pada bagian bawah pita DNA merupakan

molekul dengan bobot bervariasi yang berasal dari degradasi DNA (Prayitno dan Nuryandani 2011). Hal tersebut diperkuat oleh Uslan dan Pharmawati (2015) bahwa *smear* mengindikasikan DNA genom yang diisolasi sudah tidak utuh lagi dan kemungkinan terpotong-potong saat ekstraksi berlangsung. Adanya DNA yang terdegradasi dapat menyebabkan jumlah salinan DNA pada proses PCR berkurang. Hal ini disebabkan karena berkurangnya jumlah *template* DNA utuh yang diperlukan untuk amplifikasi. Selain itu, sedikitnya salinan DNA yang dihasilkan juga dapat mempengaruhi proses visualisasi, yaitu menyebabkan pita DNA tidak terlihat dengan jelas.

Identifikasi genotipik

Identifikasi genotipik berbasis pada amplifikasi gen 16S rRNA. Amplifikasi gen



Gambar 1. Hasil *alignment* sekuen gen *gtf* menggunakan program *MultAlin*. Warna merah menunjukkan konsesus tinggi, warna biru menunjukkan konsesus rendah dan warna hitam menunjukkan netral

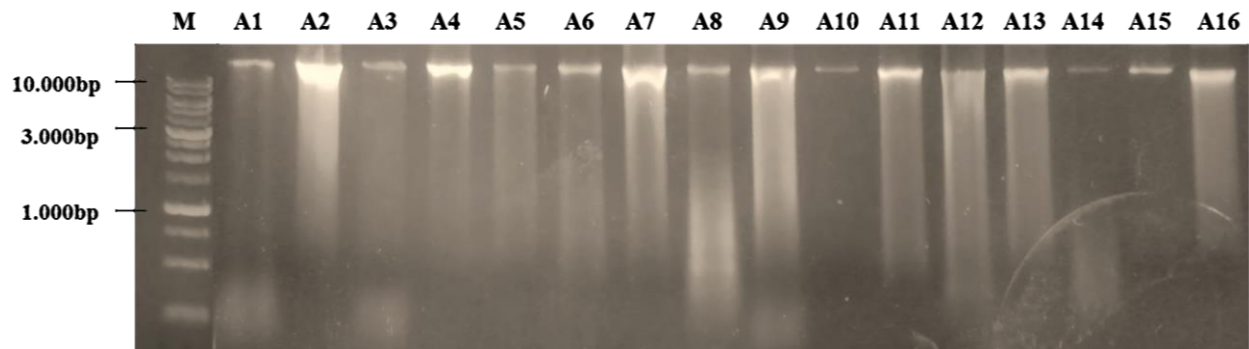
16S rRNA pada penelitian ini menggunakan primer universal. Primer universal digunakan untuk mengetahui dan memastikan bahwa isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari golongan bakteri. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan teknik PCR. Produk PCR dari 16 isolat probiotik asal ASI menggunakan primer universal pA dan pB berhasil mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA dengan ukuran amplicon sekitar 500-1.000 bp (Gambar 3). Adanya *multiple* amplicon yang muncul pada hasil elektroforesis menunjukkan bahwa ukuran wilayah 16S rRNA dapat bervariasi sehingga primer universal pA dan pB tidak hanya menempel dan mengamplifikasi pada satu daerah saja.

Konfirmasi BAL

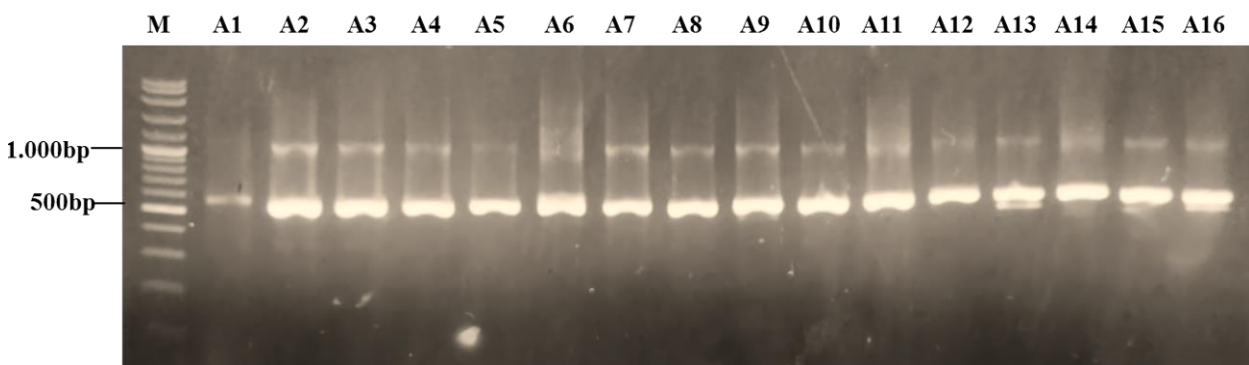
Tahap selanjutnya adalah konfirmasi isolat BAL dengan melakukan amplifikasi gen 16S rRNA dengan primer spesifik BAL. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA pada 16 isolat probiotik asal ASI menggunakan primer spesifik BAL

menunjukkan keberhasilan amplifikasi yang ditandai dengan munculnya amplicon berukuran sekitar 700 bp pada seluruh isolat (Gambar 4). Menurut Heilig et al. (2002) primer LABfw dan LABrv merupakan primer dengan sekuen target yang berlokasi pada posisi 677-693 gen 16S rRNA *Escherichia coli*. Identifikasi BAL dengan primer LABfw dan LABrv juga telah dilaporkan oleh penelitian terdahulu (Malik et al. 2010).

Anindita et al. (2018) juga telah melakukan sekuensing pada 13 isolat probiotik asal ASI yang digunakan dalam penelitian ini melalui gen 16S rRNA dengan primer *forward plb16* dan *reverse mlb16*. Hasil identifikasi dari 13 isolat asal ASI termasuk ke dalam kelompok BAL. Sebanyak 6 isolat memiliki kekerabatan terdekat dengan *L. paracasei* (99%), 2 isolat memiliki kekerabatan terdekat dengan *L. casei* (99%), 2 isolat memiliki kemiripan dengan *P. acidilactici* (99%), masing-masing 3 isolat lainnya memiliki kekerabatan dengan *L. plantarum* (99%), *P. pentosaceus* (99%) dan *W. confusa* (99%).



Gambar 2. Elektroforegram produk isolasi DNA pada gel agarose 1%. M: Marker (1 kb); A1-A16: produk PCR isolat probiotik asal ASI. *L. casei* (A1, A8, A10, A12); *L. paracasei* (A2, A3, A4, A14, A15); *W. confusa* (A5); *L. plantarum* (A6, A11); *P. acidilactici* (A7); *P. pentosaceus* (A9, A13, A16)



Gambar 3. Elektroforegram produk PCR 16S rRNA dengan primer spesifik BAL LABfw dan LABrv pada gel agarose 1,5%. M: Marker (100 bp); A1-A16: produk PCR isolat probiotik asal ASI. *L. casei* (A1, A8, A10, A12); *L. paracasei* (A2, A3, A4, A14, A15); *W. confusa* (A5); *L. plantarum* (A6, A11); *P. acidilactici* (A7); *P. pentosaceus* (A9, A13, A16)

Desain primer spesifik gen *gtf*

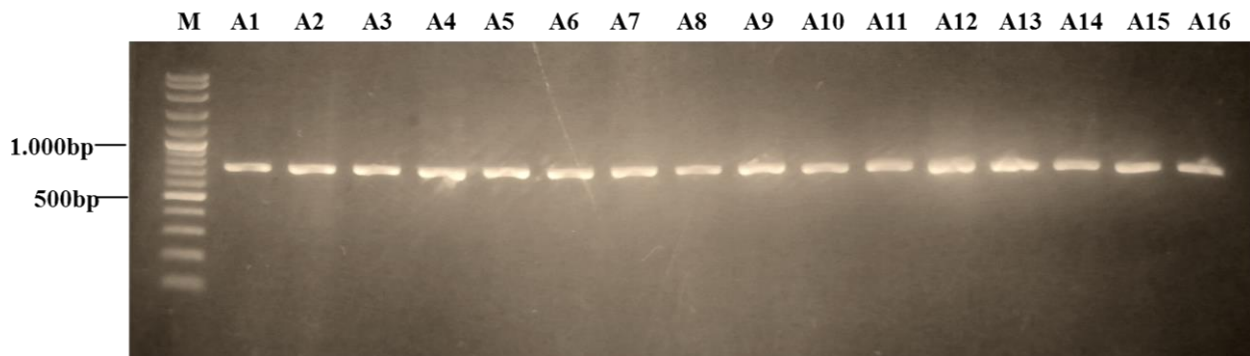
Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *gtf* adalah primer spesifik yang didisain berdasarkan hasil *alignment* dari beberapa jenis gen *gtf* yaitu dengan memilih urutan basa yang memiliki perbedaan dan tingkat konservasi rendah dengan sekuen bakteri lainnya. Sepasang primer yang berhasil didisain pada penelitian ini terdiri dari primer *forward* (posisi basa ke-372 sampai dengan basa ke-391) dengan urutan basa 5' -TGGGATCAGTCGCGACAAAG-3' dan primer *reverse* (sekuen *complement* dengan posisi basa ke-678 sampai basa ke-697) dengan urutan basa 5' -CTCCCGTGGCATAATCCCGG-3'. Panjang amplicon yang terbentuk adalah 325 bp. Selanjutnya, analisis sifat primer dilakukan untuk menguji validitas pasangan primer yang dipilih untuk menghindari munculnya pita DNA non spesifik. Berdasarkan hasil analisis, sepasang primer spesifik gen *gtf* yang didisain memiliki karakteristik yang cukup baik sebagai kandidat primer PCR

(Tabel 2). Karakteristik tersebut sesuai dengan yang dijelaskan oleh Judelson (2012) bahwa primer yang dipilih harus memiliki kriteria antara lain panjang 20-24 basa nukleotida, memiliki *melting temperature* (Tm) 55-65 °C, kandungan GC sekitar 55-65%, tidak terbentuk *hairpin loop* dan tidak ditemukan *self complementary*.

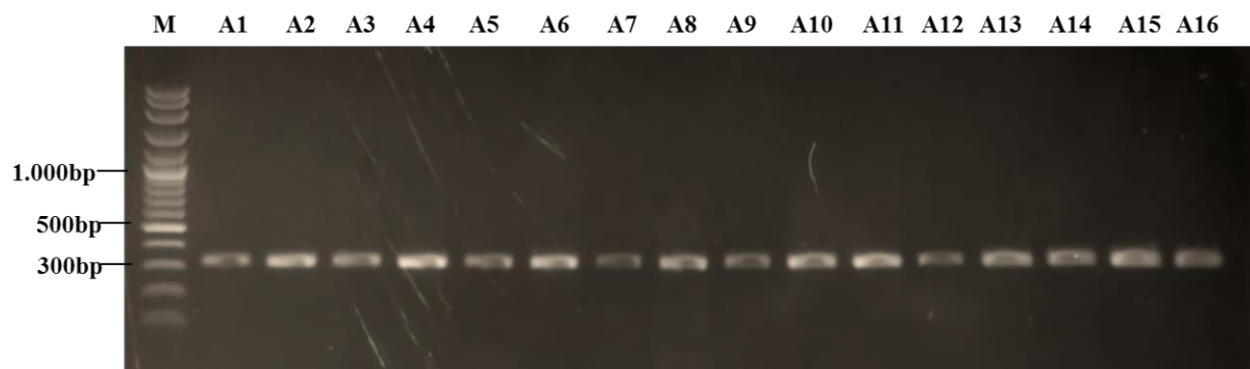
Skrining gen *gtf*

Keberadaan gen *gtf* pada isolat probiotik asal ASI dilakukan melalui amplifikasi gen *gtf* menggunakan primer spesifik hasil desain pada penelitian ini. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa primer spesifik yang didisain mampu mengamplifikasi gen penyandi *gtf* pada seluruh isolat probiotik asal ASI dengan menghasilkan amplicon berukuran sekitar 325 bp (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa 16 isolat probiotik asal ASI yang diteliti terbukti memiliki gen *gtf*.

Skrining gen *gtf* pada probiotik asal ASI juga sebelumnya telah dilaporkan oleh



Gambar 4. Elektroforegram produk PCR 16S rRNA dengan primer spesifik BAL LABfw dan LABrv pada gel agarose 1,5%. M: Marker (100 bp); A1-A16: produk PCR isolat probiotik asal ASI. *L. casei* (A1, A8, A10, A12); *L. paracasei* (A2, A3, A4, A14, A15); *W. confusa* (A5); *L. plantarum* (A6, A11); *P. acidilactici* (A7); *P. pentosaceus* (A9, A13, A16)



Gambar 5. Elektroforegram produk PCR gen *gtf* dengan primer spesifik pada gel agarose 1,5%. M: Marker (100 bp); A1-A16: produk PCR isolat probiotik asal ASI. *L. casei* (A1, A8, A10, A12); *L. paracasei* (A2, A3, A4, A14, A15); *W. confusa* (A5); *L. plantarum* (A6, A11); *P. acidilactici* (A7); *P. pentosaceus* (A9, A13, A16)

Tabel 2. Hasil analisis primer spesifik gen *gtf*

Primer (5'-3')	Panjang basa	Tm (°C)	GC content (%)	Hairpin loop	Self complementery	Panjang amplicon
<i>Forward:</i> TGGGATCAGTCGCGACAAAG	20	57,5	55	Tidak ditemukan	Tidak ditemukan	325 bp
<i>Reverse:</i> CTCCCGTGGCATAATCCCGG	20	60,4	65	Tidak ditemukan	Tidak ditemukan	

Anindita (2020) pada *W. confusa* strain AS3, AS14, AS18 dan AS21 yang memiliki gen *gtf* dengan ukuran sekitar 660 bp. Sedangkan Galle et al. (2011) melaporkan gen *gtf* dari *L. buchneri* FUA3154 asal produk minuman *bread* yang memiliki ukuran sekitar 356 bp. Menurut Badel et al. (2011), satu enzim *glukosiltransferase* bertanggung jawab untuk sintesis satu EPS sehingga dua enzim dari dua jenis gen *gtf* berbeda akan menghasilkan dua polimer EPS yang berbeda, seperti dekstran yang diproduksi *L. fermentum* Kg3 (gen *gtfKg3*) dihubungkan oleh 89% ikatan α -(1,6), sedangkan dekstran yang diproduksi *L. reuteri* 180 (gen *gtf180*) hanya dihubungkan oleh 51% ikatan α -(1,6). Hal ini menunjukkan bahwa gen *gtf* memiliki variasi berbeda dan unik pada setiap bakteri, sehingga ekspresi dari jenis gen *gtf* yang berbeda tersebut dapat berpengaruh pada aktivitas enzim *glukosiltransferase*. Adapun jenis gen *gtf* yang didapatkan pada penelitian ini masih harus dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut melalui proses sekuensing dari amplicon yang dihasilkan.

Gen *gtf* merupakan gen penyandi enzim *glukosiltransferase* yang memiliki peran penting dalam biosintesis EPS. Berdasarkan tipe lokasi isolasi, jenis EPS pada penelitian ini diperkirakan memiliki kesamaan dengan EPS yang dihasilkan oleh *L. plantarum* WLPL04 yang terdiri dari monomer xilol, glukosa dan galaktosa (Liu et al. 2017). Namun kemungkinan tersebut masih perlu dibuktikan melalui penelitian lebih lanjut mengenai produksi dan pengujian jenis EPS pada isolat probiotik asal ASI. Berdasarkan manfaat yang dihasilkan bagi kesehatan atau produk pangan, EPS maupun gen *gtf* secara tidak langsung dapat memberikan sifat fungsional pada bakteri probiotik. Oleh karena itu, adanya gen *gtf* yang berperan dalam proses biosintesis EPS dapat dijadikan sebagai salah satu parameter di masa depan dalam seleksi probiotik potensial untuk aplikasi pangan fungsional.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, 16 isolat BAL asal ASI yaitu 4 isolat *L. casei*, 5 isolat *L. paracasei*, 2 isolat *L. plantarum*, 1 isolat *W. confusa*, 1 isolat *P. acidilactici* dan 3 isolat *P. pentosaceus* terbukti memiliki gen *gtf*. Adapun ukuran amplicon yang dihasilkan yaitu sekitar 325 bp. Gen *gtf* dapat memberikan sifat fungsional sehingga dapat dijadikan sebagai salah satu parameter di masa depan dalam seleksi probiotik potensial melalui pendekatan molekuler.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih peneliti sampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Pendanaan Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun 2018 berdasarkan Surat Keputusan Nomor 7/E/KPT/2019 tertanggal 19 Februari 2019 dan Perjanjian/Kontrak nomor 111/SP2H/LT/DRPM/2019 tertanggal 11 Maret 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelin J, Kavitha M (2020) Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol* 162: 853–865. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190
- Anindita NS (2020) Identifikasi glukosiltransferase (*gtf*) penyandi eksopolisakarida pada strain *Weisella confusa* probiotik asal air susu ibu (ASI). *J Pangan Agroindustri* 8: 75–85. doi: 10.21776/ub.jp.a.2020.008.02.3
- Anindita NS, Novalina D, Sholikhah AN (2018) Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal air susu ibu sebagai kandidat probiotik dalam pangan kesehatan. *Lap Penelitian Dosen Pemula (PDP)*, Yogyakarta

- Badel S, Bernardi T, Michaud P (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol Adv* 29: 54–66. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.011
- Bagci U, Togay SO, Temiz A, Ay M (2019) Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiol (Praha)* 64: 735–750. doi: 10.1007/s12223-019-00687-2
- Castro-Bravo N, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P (2018) Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front Microbiol* 9: 2426. doi: 10.3389/fmicb.2018.02426
- Favorgen (2018) FavorPrep tissue genomic DNA extraction mini kit - User manual protocol: Isolation of DNA from animal/bacterial tissue. Favor Biotech Corp
- Fukao M, Zendo T, Inoue T, Nakayama J, Suzuki S, Fukaya T, Yajima N, Sonomoto K (2019) Plasmid-encoded glycosyltransferase operon is responsible for exopolysaccharide production, cell aggregation, and bile resistance in a probiotic strain, *Lactobacillus brevis* KB290. *J Biosci Bioeng* 128: 391–397. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.04.008
- Galle S, Schwab C, Arendt EK, Gänzle MG (2011) Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiol* 28: 547–553. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.006
- Gharbi Y, Fhoula I, Ruas-madiedo P, Afef N, Boudabous A, Gueimonde M, Ouzari HI (2018) In-vitro characterization of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human microbiota: interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. *Ann Microbiol* 69: 61–72. doi: 10.1007/s13213-018-1396-1
- Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC (2016) The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med* 21: 400–405. doi: 10.1016/j.siny.2016.05.003
- Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, de Vos WM (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 68: 114–123. doi: 10.1128/AEM.68.1.114
- Heng NCK, Yeh CW, Malik A (2017) Draft genome sequence of *Weissella confusa* MBF8-1, a glucansucrase and bacteriocin-producing strain isolated from a homemade soy product. *Genome Announc* 5: e01497. doi: 10.1128/genomeA.01497-16
- Judelson H (2012) Guidelines for designing primers. *Primer Guidelines* 10: 1–5
- Kim Y, Oh S, Yun HS, Oh S, Kim SH (2010) Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett Appl Microbiol* 51: 123–130. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02859.x
- Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS (2018) Mother's milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Front Immunol* 9: 361. doi: 10.3389/fimmu.2018.00361
- Liu Z, Zhang Z, Qiu L, Zhang F, Xu X, Wei H, Tao X (2017) Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J Dairy Sci* 100: 6895–6905. doi: 10.3168/jds.2016-11944
- Malik A, Hermawati AK, Hestingtyas M, Soemiati A, Radji M (2010) Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukansukrase dari makanan dan minuman mengandung gula. *Makara Sains* 14: 63–68. doi: 10.7454/mss.v14i1.467
- Malik A, Radji M, Kralj S, Dijkhuizen L (2009) Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol Lett* 300: 131–138. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01772.x
- Masalam MS, Bahieldin A, Alharbi MG, Al-Masaudi S, Al-Jaouni SK, Harakeh SM,

- Al-Hindi RR (2018) Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018: 7970463. doi: 10.1155/2018/7970463
- Prayitno E, Nuryandani E (2011) Optimization of DNA extraction of physic nut (*Jatropha curcas*) by selecting the appropriate leaf. *Nus Biosci* 3: 1–6. doi: 10.13057/nusbiosci/n030101
- Rajoka MSR, Jin M, Haobin Z, Li Q, Shao D, Jiang C, Huang Q, Yang H, Shi J, Hussain N (2018) Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT - Food Sci Technol* 89: 638–647. doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.034
- Reis NA, Saraiva MAF, Duarte EAA, de Carvalho EA, Vieira BB, Evangelista-Barreto NS (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J Appl Microbiol* 121: 811–820. doi: 10.1111/jam.13173
- Stack HM, Kearney N, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP (2010) Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal *Lactobacilli*. *Appl Environ Microbiol* 76: 500–507. doi: 10.1128/AEM.01524-09
- Surayot U, Wang J, Seesuriyachan P, Kuntiya A, Tabarsa M, Lee Y, Kim JK, Park WJ, You SG (2014) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : Structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *Int J Biol Macromol* 68: 233–240. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.005
- Tabibloghmany FS, Ehsandoost E (2014) An overview of healthy and functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry. *Eur J Nutr Food Saf* 4: 63–86. doi: 10.9734/ejnfs/2014/6948
- Tamang JP, Shin DH, Jung SJ, Chae SW (2016) Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front Microbiol* 7: 578. doi: 10.3389/fmicb.2016.00578
- Uslan U, Pharmawati M (2015) Optimasi konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada reaksi *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* untuk analisis keragaman genetik tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br). *J Bios Logos* 5: 26–34. doi: 10.35799/jbl.5.1.2015.9316